



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0035412

(51)¹⁹ C07H 19/00; G01N 33/483; G01N 27/26 (13) B

(21) 1-2019-07389

(22) 13/02/2019

(86) PCT/US2019/017830 13/02/2019

(87) WO2019/160937 22/08/2019

(30) 62/710,465 16/02/2018 US

(45) 25/04/2023 421

(43) 25/05/2021 398

(73) ILLUMINA, INC. (US)

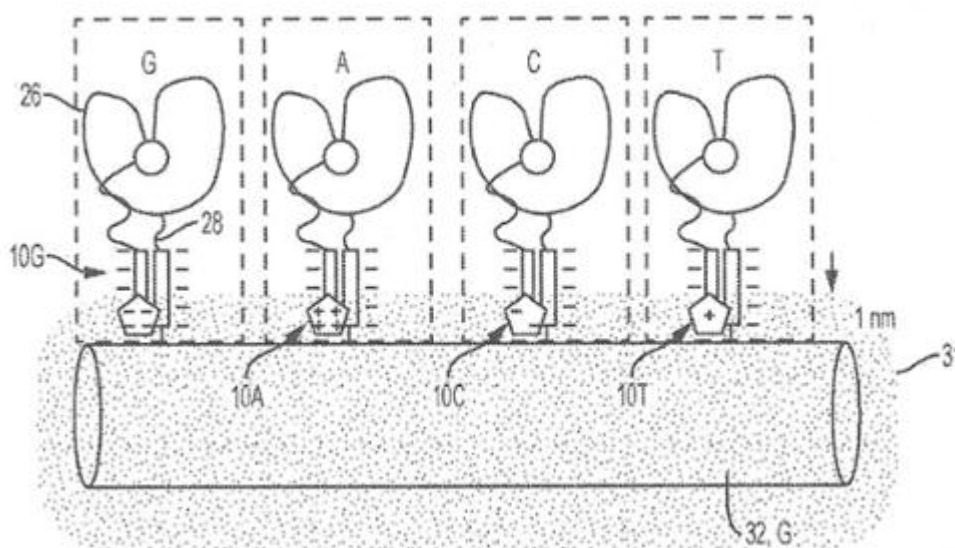
5200 Illumina Way San Diego, CA 92122 (US)

(72) MANDELL, Jeffrey (US); BARNARD, Steven (US); MOON, John (US); ROBERT BACIGALUPO, Maria Candelaria (US).

(74) Công ty Cổ phần Sở hữu công nghiệp INVESTIP (INVESTIP)

(54) NUCLEOTIT ĐƯỢC ĐÁNH DẤU, PHƯƠNG PHÁP GIẢI TRÌNH TỰ SỬ DỤNG NUCLEOTIT ĐƯỢC ĐÁNH DẤU VÀ BỘ KIT BAO GỒM NUCLEOTIT ĐƯỢC ĐÁNH DẤU

(57) Sáng chế đề cập đến nucleotit được đánh dấu chứa nucleotit, phân tử liên kết được gắn vào nhóm phosphat của nucleotit, và thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử được gắn vào phân tử liên kết. Thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử được oxy hóa hoặc được khử bằng kênh dẫn điện khi được duy trì ở gần vùng cảm biến của kênh dẫn điện.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến nucleotit được đánh dấu gồm nucleotit, phân tử liên kết được gắn với nhóm phosphat của nucleotit, và thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử được gắn vào phân tử liên kết. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp giải trình tự sử dụng nucleotit được đánh dấu và bộ kit bao gồm các nucleotit được đánh dấu.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Nhiều quy trình thí nghiệm trong nghiên cứu sinh học hoặc hóa học bao gồm thực hiện số lượng lớn các phản ứng được điều khiển trên các bề mặt giá đỡ cục bộ hoặc bên trong các buồng phản ứng được xác định trước. Các phản ứng được định rõ có thể sau đó được quan sát hoặc được dò và sự phân tích sau đó có thể giúp nhận biết hoặc bộc lộ các tính chất của các chất hóa học tham gia vào phản ứng. Trong một số ví dụ, các phản ứng được điều khiển tạo ra huỳnh quang, và vì vậy hệ thống quang học có thể được sử dụng để phát hiện. Trong các ví dụ khác, các phản ứng được điều khiển làm thay đổi điện tích, độ dẫn điện, hoặc một số tính chất về điện khác, và vì vậy hệ thống điện tử có thể được sử dụng để phát hiện.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất nucleotit được đánh dấu và được cụ thể hóa trong các mục từ số 1 đến 6.

Mục 1: Theo một phương án, nucleotit được đánh dấu bao gồm nucleotit; phân tử liên kết được gắn vào nhóm phosphat của nucleotit; và thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử được gắn vào phân tử liên kết, thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử được oxy hóa hoặc được khử bởi kênh dẫn điện khi được duy trì ở gần vùng cảm biến của kênh dẫn điện.

Mục 2: Theo phương án (1) của nucleotit được đánh dấu, thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử chứa nguyên tử kim loại được tạo phức mà sẽ tham gia phản ứng oxy hóa-khử.

Mục 3: Theo phương án (1) hoặc (2) của nucleotit được đánh dấu, phân tử liên kết bao gồm vùng đặc hiệu được gắn vào thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử.

Mục 4: Theo phương án (3), vùng đặc hiệu là để tương tác với vùng chất nhận trên phân tử nối được liên kết với kênh dẫn điện, và vùng đặc hiệu chứa thẻ ái lực.

Mục 5: Theo phương án (4), vùng đặc hiệu là để lai với vùng chất nhận trên phân tử nối được liên kết với kênh dẫn điện, và thẻ ái lực chứa trình tự nucleotit có từ khoảng một nucleotit đến khoảng mười nucleotit hoặc trình tự axit peptit nucleic có từ khoảng một axit peptit nucleic đến khoảng mười axit peptit nucleic.

Mục 6: Theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ (1) đến (5) của nucleotit được đánh dấu, thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử chứa 10 điện tích hoặc ít hơn ở trạng thái không được oxy hóa hoặc không được khử; và thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử chứa từ khoảng 1 điện tích đến gần 100 điện tích ở trạng thái được oxy hóa hoặc được khử.

Được hiểu là dấu hiệu bất kỳ của nucleotit được đánh dấu được đề cập ở đây, bao gồm các phương án từ (1) đến (6), có thể được kết hợp cùng nhau theo cách và/hoặc cấu hình mong muốn bất kỳ.

Khía cạnh thứ hai được đề cập ở đây là phương pháp được cụ thể hoá trong các mục từ 7 đến 18 dưới đây.

Mục 7: Theo một phương án, phương pháp theo sáng chế bao gồm đưa axit nucleic khuôn vào kênh dẫn điện có polymeraza được gắn ở đó; đưa các nucleotit được đánh dấu vào kênh dẫn điện này, ít nhất một nucleotit được đánh dấu trong số các nucleotit được đánh dấu này bao gồm nucleotit và thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử đặc hiệu nucleotit được gắn vào đó, nhờ đó một trong số các nucleotit được đánh dấu này kết hợp với polymeraza; trong khi một trong số các nucleotit được đánh dấu của các nucleotit được đánh dấu được kết hợp, bắt đầu phản ứng oxy hóa-khử giữa thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử đặc hiệu nucleotit và kênh dẫn điện để làm thay đổi trạng thái điện tích của thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử đặc hiệu nucleotit này; và đáp ứng với phản ứng oxy hóa-khử, phát hiện sự đáp ứng của kênh dẫn điện này.

8. Theo mục (7) về phương pháp theo sáng chế, việc bắt đầu phản ứng oxy hóa-khử bao gồm nạp điện áp tải vào kênh dẫn điện; và phát hiện đáp ứng của kênh dẫn điện này bao gồm việc nạp điện áp đọc vào kênh dẫn điện.

9. Phương pháp theo mục (7) hoặc (8) còn bao gồm việc kết hợp sự đáp ứng của kênh dẫn điện với thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử đặc hiệu nucleotit của một trong số các nucleotit được đánh dấu được kết hợp; và dựa trên thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử đặc hiệu nucleotit, xác định nucleotit của nucleotit được đánh dấu được kết hợp này.

10. Phương pháp theo mục (9) cũng còn có thể bao gồm việc cắt thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử đặc hiệu nucleotit từ một trong số các nucleotit được đánh dấu được kết hợp, nhờ đó nucleotit của nucleotit được đánh dấu được kết hợp này được hợp nhất vào mạch mới mà bổ sung với axit nucleic khuôn.

11. Phương pháp theo mục (10), gộp chung các bước gồm việc kết hợp của một trong số các nucleotit được đánh dấu, việc bắt đầu phản ứng oxy hóa-khử, phát hiện, việc kết hợp, và việc xác định là chu kỳ giải trình tự; và phương pháp này còn bao gồm việc thực hiện chu kỳ giải trình tự tiếp theo bằng cách cho phép nucleotit được đánh dấu tiếp theo của các nucleotit được đánh dấu kết hợp với polymeraza; trong khi nucleotit được đánh dấu tiếp theo của các nucleotit được đánh dấu được kết hợp, việc bắt đầu phản ứng oxy hóa-khử khác giữa thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử đặc hiệu nucleotit khác và kênh dẫn điện để làm thay đổi trạng thái điện tích của thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử đặc hiệu nucleotit khác; trong đáp ứng với phản ứng oxy hóa-khử khác, việc xác định đáp ứng khác của kênh dẫn điện; việc kết hợp đáp ứng khác của kênh dẫn điện với thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử đặc hiệu nucleotit khác; và dựa trên thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử đặc hiệu nucleotit khác, việc xác định nucleotit của nucleotit được đánh dấu tiếp theo của các nucleotit được đánh dấu.

12. Phương pháp theo mục (11) cũng còn có thể bao gồm việc cắt thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử đặc hiệu nucleotit khác của một trong số các nucleotit được đánh dấu tiếp theo, nhờ đó nucleotit của một trong số các nucleotit được đánh dấu tiếp theo này được hợp nhất vào mạch mới bổ sung với axit nucleic khuôn; và lặp lại chu kỳ giải trình tự.

13. Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ (7) đến (12), thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử chứa nguyên tử kim loại được tạo phức để tham gia phản ứng oxy hóa-khử.

14. Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ (7) đến (13), thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử chứa 10 điện tích hoặc ít hơn ở trạng thái không được oxy hóa hoặc không được khử; và thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử chứa từ khoảng 1 điện tích đến gần 100 điện tích ở trạng thái điện tích đã thay đổi.

15. Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ (7) đến (14), các nucleotit được đánh dấu chứa nucleotit được đánh dấu thứ nhất có deoxyadenosin polyphosphat làm nucleotit và thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử đặc hiệu nucleotit thứ nhất; nucleotit được đánh dấu thứ hai chứa deoxyguanosin polyphosphat làm nucleotit và thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử đặc hiệu nucleotit thứ hai; nucleotit được đánh dấu thứ ba chứa deoxytydin polyphosphat làm nucleotit và thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử đặc hiệu nucleotit thứ ba; và nucleotit được đánh dấu thứ tư chứa deoxythymidin polyphosphat làm nucleotit và thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử đặc hiệu nucleotit thứ tư; và các thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử đặc hiệu nucleotit thứ nhất, thứ hai, thứ ba và thứ tư là khác nhau.

16. Phương pháp theo mục (15), hai thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử của các thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử đặc hiệu nucleotit thứ nhất, thứ hai, thứ ba và thứ tư có điện tích dương ở trạng thái điện tích đã thay đổi, và trong đó hai thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử còn lại của các thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử đặc hiệu nucleotit thứ nhất, thứ hai, thứ ba và thứ tư có điện tích âm ở trạng thái điện tích đã thay đổi.

17. Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ (7) đến (16) của phương pháp, các nucleotit được đánh dấu có mặt trong đệm có nồng độ muối thấp.

18. Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ (7) đến (17) của phương pháp, kênh dẫn điện là kênh của tranzito hiệu ứng trường.

Được hiểu là một số dấu hiệu bất kỳ của phương pháp, bao gồm khía cạnh theo mục từ (7) đến (17), có thể được kết hợp cùng nhau theo cách mong muốn bất kỳ. Ngoài ra, được hiểu là sự kết hợp bất kỳ của các dấu hiệu của phương pháp này và/hoặc của

nucleotit được đánh dấu có thể được sử dụng cùng nhau, và/hoặc được kết hợp với ví dụ bất kỳ của các ví dụ được đề cập ở đây.

Khía cạnh thứ ba được đề cập ở đây là bộ kit. Mục số 19 đến 22 đề cập đến khía cạnh thứ ba này.

19. Trong một phương án, bộ kit bao gồm tế bào chảy, chứa kênh dẫn điện có phân tử nối được gắn thêm vào đó và polymeraza được gắn vào kênh dẫn điện thông qua phân tử nối; axit nucleic khuôn được đưa vào tế bào chảy; các chất phản ứng được đưa vào tế bào chảy, các chất phản ứng chứa các nucleotit được đánh dấu, ít nhất một trong số các nucleotit được đánh dấu chứa: nucleotit; phân tử liên kết được gắn vào nhóm phosphat của nucleotit; và thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử được gắn vào phân tử liên kết, thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử được oxy hóa hoặc được khử nhờ kênh dẫn điện khi được duy trì ở gần vùng cảm biến của kênh dẫn điện; và bộ dò để phát hiện đáp ứng từ kênh dẫn điện khi phản ứng oxy hóa-khử xảy ra giữa thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử và kênh dẫn điện.

20. Bộ kit theo mục (19), thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử được chọn lọc từ nhóm bao gồm feroxen, kẽm tetrabenzoporphyrin, coban phthaloxyanin, tris-(2,2'-bipyrimidin)ruteni, rượu 4-feroxenylbenzyl, 5-(4-hydroxymetylphenyl)-10,15,20-trimesitylporphinato kẽm(II), và calixaren hoạt tính oxy hóa-khử.

21. Bộ kit theo mục bất kỳ trong số các mục từ (19) hoặc (20), thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử chứa 10 điện tích hoặc ít hơn ở trạng thái không được oxy hóa hoặc không được khử; và thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử chứa từ khoảng 1 điện tích đến khoảng 100 điện tích ở trạng thái được oxy hóa hoặc được khử.

22. Bộ kit theo mục bất kỳ trong số các mục từ (19) đến (21), kênh dẫn điện là kênh của tranzito hiệu ứng trường.

Được hiểu là một số dấu hiệu bất kỳ của bộ kit này, bao gồm bộ kit theo mục bất kỳ trong số các mục từ (19) đến (22), có thể được kết hợp cùng nhau theo cách mong muốn bất kỳ. Ngoài ra, được hiểu là sự kết hợp bất kỳ của các dấu hiệu của bộ kit này và/hoặc của phương pháp và/hoặc của nucleotit được đánh dấu có thể được sử dụng cùng nhau, và/hoặc được kết hợp với ví dụ bất kỳ của các ví dụ được đề cập ở đây.

Ngoài ra, được hiểu là một số dấu hiệu bất kỳ của nucleotit được đánh dấu bất kỳ của các nucleotit được đánh dấu và/hoặc của phương pháp bất kỳ của các phương pháp và/hoặc của bộ kit bất kỳ của các bộ kit có thể được kết hợp cùng nhau theo cách mong muốn bất kỳ, và/hoặc có thể được kết hợp với ví dụ bất kỳ của các ví dụ được đề cập ở đây.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các dấu hiệu của các ví dụ của sáng chế sẽ trở nên dễ thấy bằng cách viện dẫn đến phần mô tả chi tiết sáng chế và các hình vẽ dưới đây, trong đó giống như các số chỉ dẫn tương ứng với các thành phần tương tự, mặc dù có thể không giống. Vì tính ngắn gọn, các số chỉ dẫn hoặc các dấu hiệu có chức năng được mô tả trước đó có thể hoặc không thể được mô tả khi kết hợp với các hình vẽ khác mà chúng xuất hiện.

Fig. 1 là hình vẽ giản lược của ví dụ về nucleotit được đánh dấu;

Fig. 2 là hình vẽ giản lược và phối cảnh một phần của ví dụ về hệ thống được đề cập theo sáng chế;

Fig. 3 là hình vẽ giản lược của các polymeraza được gắn vào kênh dẫn điện của bộ cảm biến điện tích và được kết hợp với các nucleotit được đánh dấu mà có thể được phân biệt dựa trên điện tích;

Fig. 4 là sơ đồ dòng minh họa ví dụ về phương pháp được đề cập trong đây;

Fig. 5A là hình vẽ giản lược của ví dụ về nucleotit được đánh dấu được sử dụng trong phương pháp giải trình tự; và

Fig. 5B là hình vẽ giản lược của ví dụ về sự tương tác giữa phân tử nổi và vùng đặc hiệu của ví dụ về nucleotit được đánh dấu được đề cập theo sáng chế.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các nucleotit được đánh dấu được đề cập trong đây có thể được sử dụng cho phát hiện phân tử đơn trong các quy trình giải trình tự axit nucleic. Bộ cảm biến được sử dụng trong phát hiện phân tử đơn có thể có một kênh dẫn điện với một polymeraza được gắn thêm vào đó. Điều này tạo khả năng cho một sự kiện hợp nhất (tức là, sự hợp nhất của bazơ vào mạch mới nhờ polymeraza) để được dò tại thời điểm tại mỗi bộ cảm biến riêng

rẽ. Các nucleotit được đánh dấu cung cấp phương thức dò độ sâu có thể được sử dụng cho việc giải trình tự axit nucleic và cho phát hiện các axit nucleic và các chất phân tích khác nói chung.

Ví dụ về nucleotit được đánh dấu 10 được vẽ giản lược trên Fig. 1. Như được thể hiện trên hình vẽ, nucleotit được đánh dấu 10 chứa nucleotit 12, phân tử liên kết 14 hoặc 14' được gắn vào nhóm phosphat 16 của nucleotit 12, và thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử 18 được gắn vào phân tử liên kết 14 hoặc 14', thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử 18 được oxy hóa hoặc được khử nhờ kênh dẫn điện (số chỉ dẫn 32, Fig. 2) khi được duy trì ở gần vùng cảm biến (số chỉ dẫn 31, Fig. 3) của kênh dẫn điện 32. Nucleotit được đánh dấu 10 có thể được xem như nucleotit không tự nhiên hoặc nucleotit tổng hợp bởi vì nó khác về mặt cấu trúc hoặc hóa học với nucleotit tự nhiên.

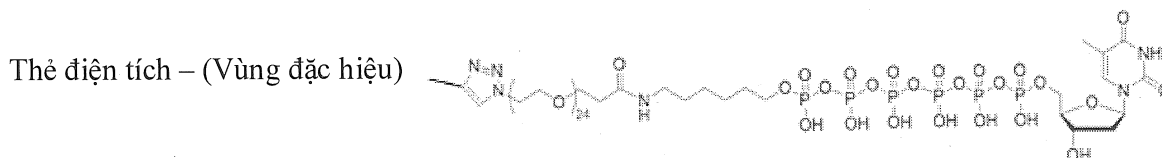
Nucleotit 12 của nucleotit được đánh dấu 10 có thể là nucleotit tự nhiên. Các nucleotit tự nhiên chứa bazơ dị vòng 20 chứa nitơ, đường 22, và một hoặc nhiều nhóm phosphat 16. Các ví dụ về các nucleotit tự nhiên bao gồm, ví dụ, các ribonucleotit hoặc các deoxyribonucleotit. Trong ribonucleotit, đường 22 là riboza, và trong các deoxyribonucleotit, đường 22 là deoxyriboza, tức là đường thiếu nhóm hydroxyl có mặt tại vị trí 2' trong riboza. Trong ví dụ, nucleotit 12 là ở dạng polyphosphat bởi vì nó chứa nhiều nhóm phosphat 16 (ví dụ, tri-phosphat (tức là, gamma phosphat), tetra-phosphat, penta-phosphat, hexa-phosphat, v.v). Bazơ dị vòng 20 (tức là, nucleobazơ) có thể là bazơ purin hoặc bazơ pyrimidin. Các bazơ purin chứa adenin (adenine - A) và guanin (guanine - G), và các dẫn xuất được biến đổi hoặc các chất tương tự của chúng. Các bazơ pyrimidin chứa xytosin (cytosine - C), thymine (thymine - T), và uraxil (uracil - U), và các dẫn xuất được biến đổi hoặc các chất tương tự của chúng. Nguyên tử C-1 của deoxyriboza được liên kết với N-1 của pyrimidin hoặc N-9 của purin. Chất tương tự axit nucleic có thể có bất kỳ bộ khung phosphat, đường, hoặc nucleobazơ được thay đổi. Các ví dụ về các chất tương tự axit nucleic bao gồm, ví dụ, các chất tương tự các bazơ phổ biến hoặc bộ khung phosphat-đường, như là các axit peptit nucleic (peptide nucleic acid - PNA).

Nucleotit được đánh dấu 10 cũng chứa phân tử liên kết 14 hoặc 14'. Trong một số ví dụ, phân tử liên kết (được thể hiện như là 14 trên Fig. 1) không chứa vùng đặc hiệu 24. Trong các ví dụ khác, phân tử liên kết (được thể hiện như là 14' trên Fig. 1) chứa vùng

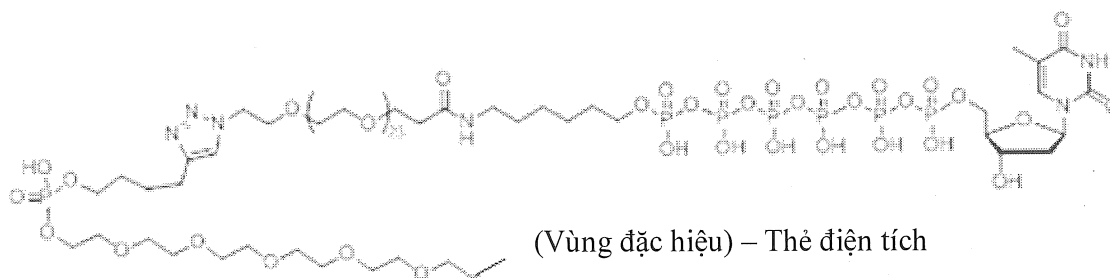
đặc hiệu 24. Như được vẽ giản lược trên Fig. 1, khi vùng đặc hiệu 24 là phần của phân tử liên kết 14', vùng 24 có thể được đặt tại đầu mà liên kết hóa học với thể điện tích hoạt tính oxy hóa-khử 18. Vùng đặc hiệu 24 sẽ còn được mô tả ở điểm tiếp theo của tài liệu này.

Phân tử liên kết 14 hoặc 14' của nucleotit được đánh dấu 10 có thể là phân tử chuỗi dài bất kỳ mà có thể liên kết hóa học, tại một đầu, với nhóm phosphat 16 của nucleotit 12 và có thể liên kết hóa học, tại đầu còn lại, với thể điện tích hoạt tính oxy hóa-khử 18. Phân tử liên kết 14 hoặc 14' cũng có thể được chọn lọc sao cho nó sẽ không tương tác với polymeraza 26 được sử dụng trong hệ thống 30 (xem Fig. 2) được đề cập ở đây. Phân tử liên kết 14 hoặc 14' được chọn lọc sao cho nó đủ dài để cho phép thể điện tích hoạt tính oxy hóa-khử 18 nằm bên trong vùng cảm biến 31 (Fig. 3) của kênh dẫn điện 32 (Fig. 2). Như các ví dụ, phân tử liên kết 14 hoặc 14' có thể chứa chuỗi alkyl, chuỗi poly(etylen glycol), nhóm amido, nhóm phosphat, dị vòng như là triazol, các nucleotit, hoặc các sự kết hợp của chúng. Các ví dụ về chuỗi alkyl có thể chứa ít nhất 6 nguyên tử cacbon và các ví dụ về chuỗi poly(etylen glycol) có thể chứa ít nhất 3 đơn vị etylen glycol.

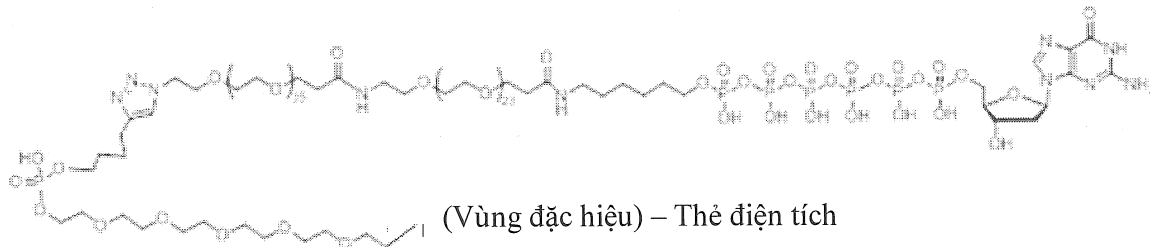
Ví dụ dưới đây minh họa ví dụ về nucleotit được đánh dấu 10, tại đó phân tử liên kết 14, 14' bao gồm chuỗi alkyl, nhóm amit, chuỗi poly(etylen glycol), và triazol:



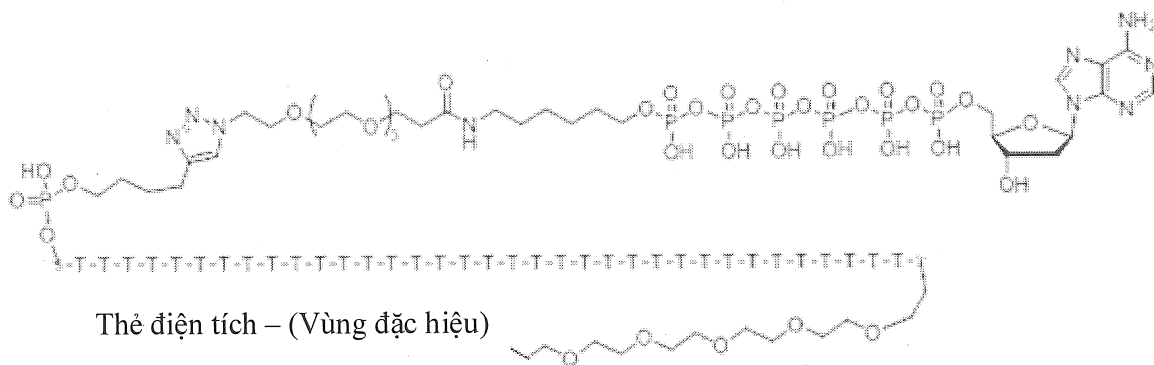
Ví dụ dưới đây minh họa ví dụ khác về nucleotit được đánh dấu 10, tại đó phân tử liên kết 14, 14' bao gồm các chuỗi alkyl, nhóm amit, các chuỗi poly(etylen glycol), triazol, và nhóm phosphat:



Ví dụ dưới đây còn minh họa ví dụ khác về nucleotit được đánh dấu 10, tại đó phân tử liên kết 14, 14' bao gồm các chuỗi alkyl, các nhóm amit, các chuỗi poly(etylen glycol), triazol, và nhóm phosphat:



Ví dụ dưới đây minh họa ví dụ khác về nucleotit được đánh dấu 10, tại đó phân tử liên kết 14, 14' bao gồm các chuỗi alkyl, nhóm amit, các chuỗi poly(etylen glycol), triazol, nhóm phosphat và chuỗi polynucleotit:



Trong khi nhiều phân tử liên kết 14, 14' ví dụ đã được mô tả, được hiểu là các phân tử liên kết 14, 14' khác có thể được sử dụng.

Như được thể hiện trên Fig. 1 và các ví dụ trước, một số nucleotit được đánh dấu 10 cũng có thể chứa vùng đặc hiệu 24 như phần của phân tử liên kết 14'. Vùng đặc hiệu 24 có khả năng tương tác với vùng chất nhận trên phân tử nối 28 (Fig. 2) mà được liên kết với kênh dẫn điện 32. Vùng đặc hiệu 24 có thể chứa thẻ ái lực, có thể gắn tạm thời vào vùng chất nhận của phân tử nối 28. Ái lực liên kết của thẻ ái lực có thể đủ mạnh để liên kết vùng đặc hiệu 24 với vùng chất nhận trên phân tử nối 28 khi nucleotit được đánh dấu 10 được giữ bởi polymeraza 26, nhưng cũng có thể đủ yếu để giải phóng vùng đặc hiệu 24 ra khỏi vùng chất nhận sau sự kiện hợp nhất (ví dụ, khi polymeraza 26 cắt một cách tự nhiên liên kết giữa phosphat alpha và phân tử liên kết 14, 14' hoặc giữa phosphat alpha và

phosphat beta). Nói cách khác, các tỷ lệ bật và tắt của vùng đặc hiệu 24 (ví dụ, thẻ ái lực) đến và từ vùng chất nhận có thể được chọn lọc để cải thiện cảm biến toàn bộ phân tử đơn. Tỷ lệ bật của tương tác thẻ ái lực/vùng chất nhận có thể cao, ví dụ, do nồng độ cao một cách hiệu quả của vùng đặc hiệu 24, và theo đó là thẻ ái lực, trước sự hợp nhất nucleotit. Tỷ lệ bật cao này làm tăng phần thời gian mà thẻ ái lực được liên kết với vùng chất nhận. Sau khi cắt, tỷ lệ tắt sự tương tác cũng có thể được chọn lọc để đủ cao sao cho phức hợp (giữa thẻ ái lực và vùng chất nhận) phân ly đủ nhanh sao cho có xác suất thấp của trạng thái liên kết (giữa thẻ ái lực của nucleoit và vùng chất nhận được hợp nhất trước đó) khi nucleotit được đánh dấu 10 tiếp theo đi vào vị trí hoạt động của polymeraza 26.

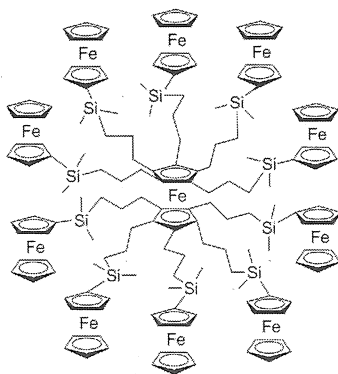
Trong ví dụ cụ thể, vùng đặc hiệu 24 là để lại với vùng chất nhận trên phân tử nối 28, và vì vậy thẻ ái lực có thể chứa trình tự nucleotit hoặc trình tự axit peptit nucleic mà có khả năng gắn tạm thời vào vùng chất nhận trên phân tử nối 28 (Fig. 2). Trong ví dụ, thẻ ái lực chứa trình tự nucleotit chứa từ khoảng một nucleotit đến khoảng mười nucleotit hoặc từ khoảng một axit peptit nucleic đến khoảng mười axit peptit nucleic. Trong các ví dụ khác, thẻ ái lực chứa đến sáu nucleotit hoặc axit peptit nucleic. Trong ví dụ khác (như còn được thể hiện và mô tả trên Fig. 5B), vùng đặc hiệu 24 còn có thể chứa (các) inosin gắn sườn cả hai đầu của trình tự nucleotit. Trong các ví dụ khác nữa, thẻ ái lực có thể là phần phân tử không phải axit nucleic, như là các peptit mà có ái lực với nhau hoặc với các polymer kỵ nước. Ví dụ protein đặc hiệu chứa cuộn dạng cuộn, là mô tip cấu trúc trong các protein mà có 2–7 vòng xoắn alpha được cuộn cùng nhau giống như các sợi của dây thừng. Nói cách khác, các cuộn dạng cuộn được xây dựng bởi hai hoặc nhiều vòng xoắn alpha hơn mà cuốn xung quanh nhau để tạo thành siêu cuộn. Các ví dụ về các cuộn dạng cuộn chứa các protein sinh ung thư như là c-Fos và c-jun.

Thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử 18 có thể là thẻ điện tích bất kỳ mà có khả năng tăng điện tích của nó khi được oxy hóa (mất electron) hoặc được khử (thêm electron) nhờ kênh dẫn điện 32, ví dụ, khi được duy trì ở gần vùng cảm biến 31 của kênh dẫn điện 32. Thẻ điện tích 18 có thể tổng thể trung hòa (điện tích bằng không), hoặc gần với trạng thái này (10 điện tích hoặc ít hơn), trước khi phản ứng oxy hóa-khử xảy ra. Nói cách khác, ở trạng thái không được oxy hóa hoặc không được khử, thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử 18 mang 10 điện tích hoặc ít hơn. Các điện tích được mang bởi thẻ điện tích

hoạt tính oxy hóa-khử 18 không chứa bất kỳ điện tích nào của phosphat 16 hoặc của phân tử liên kết 14, 14' của nucleotit được đánh dấu 10. Sau khi phản ứng oxy hóa-khử xảy ra, tổng điện tích toàn bộ của thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử 18 thay đổi (tức là, nó mang nhiều điện tích dương hơn hoặc nhiều điện tích âm hơn). Trong ví dụ, thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử 18 chứa 10 điện tích hoặc ít hơn ở trạng thái không được oxy hóa hoặc không được khử, và thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử 18 chứa từ khoảng 1 điện tích đến khoảng 100 điện tích ở trạng thái được oxy hóa hoặc được khử. Được hiểu là số lượng điện tích của thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử 18 ở trạng thái không được oxy hóa hoặc không được khử là ít hơn số lượng điện tích của thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử 18 ở trạng thái được oxy hóa hoặc được khử. Trong ví dụ khác, thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử 18 chứa 10 điện tích hoặc ít hơn ở trạng thái không được oxy hóa hoặc không được khử, và thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử 18 chứa từ khoảng 20 điện tích đến khoảng 50 điện tích ở trạng thái được oxy hóa hoặc được khử.

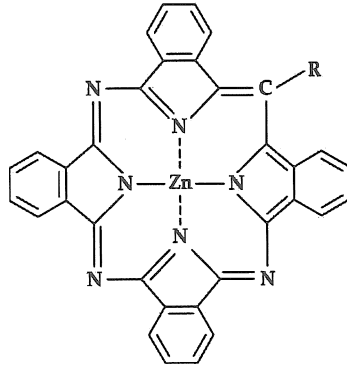
Thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử 18 có thể chứa bất kỳ nguyên tử kim loại được phối hợp (tức là, được giữ tại chỗ) có thể tham gia phản ứng oxy hóa-khử. Các ví dụ về các nguyên tử kim loại gồm sắt, coban, ruteni, kẽm, đồng, lithi, bạc, v.v. Như một số ví dụ cụ thể, thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử 18 được chọn lọc từ nhóm gồm feroxen, kẽm tetrabenzoporphyrin, coban phtaloxyanin, tris-(2,2'-bipyrimidin)ruteni, rượu 4-feroxenylbenzyl, kẽm (II) 5-(4-hydroxymethylphenyl)-10,15,20-trimesitylporphinato, và calixaren hoạt tính oxy hóa-khử.

Feroxen có thể là hợp chất kim loại hữu cơ bất kỳ có công thức $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)_2$. Ví dụ cụ thể là dendrime feroxen:

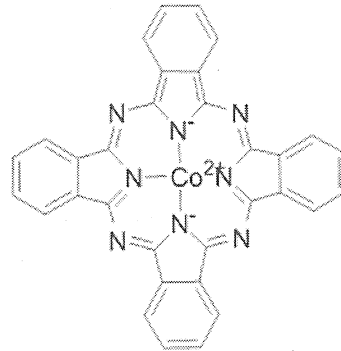


trong đó Fe^{2+} có thể trở thành Fe^{3+} sau quá trình oxy hóa, theo đó thêm điện tích dương vào mỗi “Fe”.

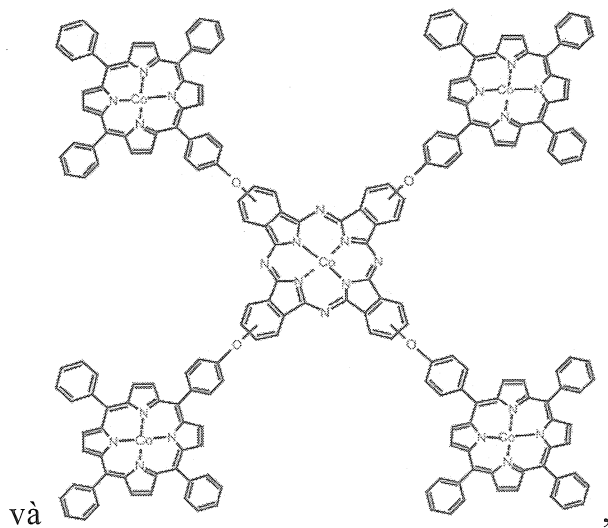
Kẽm tetrabenzoporphyrin có cấu trúc:



trong đó $\text{R}=\text{C}_2\text{H}_5$, C_6H_{13} , hoặc $\text{C}_{12}\text{H}_{25}$. Zn^{1+} có thể trở thành Zn^{2+} sau quá trình oxy hóa, theo đó thêm điện tích dương.

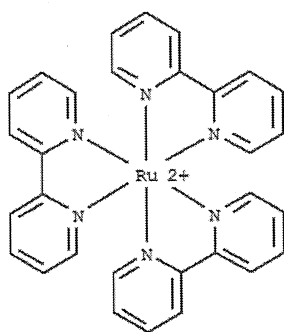


Các ví dụ về coban phthaloxyanin bao gồm:



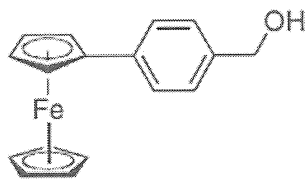
cả hai đều là các phân tử tổng trung hòa trong dung dịch. Sau quá trình oxy hóa, Co^{2+} trở thành Co^{3+} , vì vậy thêm điện tích dương vào mỗi “Co” (ví dụ, một điện tích dương cho cấu trúc thứ nhất và năm điện tích dương cho cấu trúc thứ hai). Các hợp chất chứa coban khác với các trạng thái oxy hóa nằm trong khoảng từ -3 đến +5 được biết rõ và có thể được sử dụng như là các thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử có thể tạo điện tích âm 18 hoặc các thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử có thể tạo điện tích dương 18.

Tris-(2,2'-bipyrimidin)ruteni có cấu trúc:



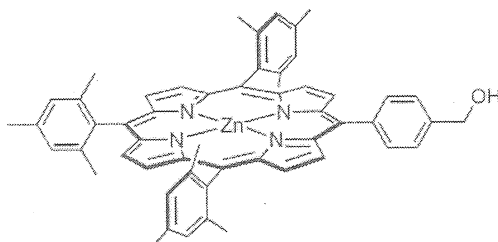
trong đó Ru^{2+} có thể trở thành Ru^{3+} sau quá trình oxy hóa, theo đó thêm điện tích dương.

rượu 4-feroxenylbenzyl có cấu trúc:



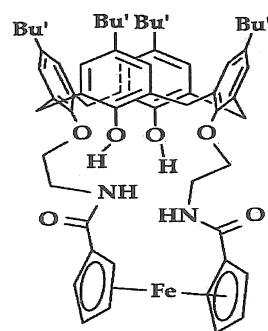
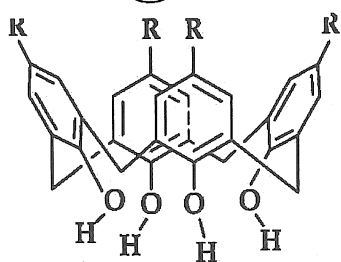
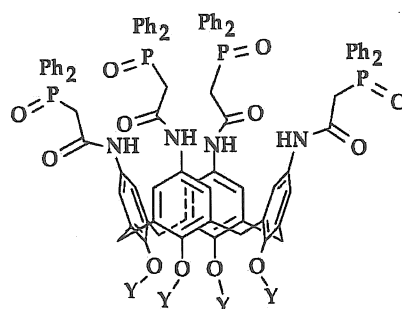
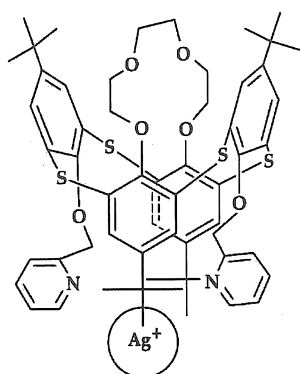
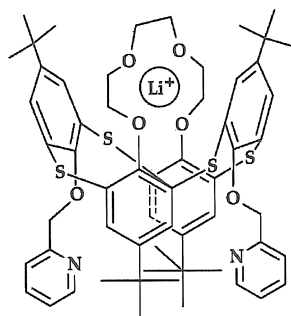
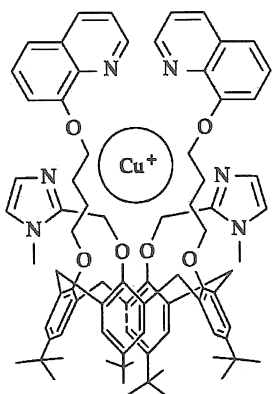
trong đó Fe^{2+} có thể trở thành Fe^{3+} sau quá trình oxy hóa, theo đó thêm điện tích dương.

kẽm (II)5-(4-hydroxymethylphenyl)-10,15,20-trimesitylporphinato có cấu trúc:



trong đó Zn^{2+} có thể trở thành Zn^{1+} sau khi khử, theo đó thêm điện tích âm.

Một số ví dụ về các calixaren hoạt tính oxy hóa-khử chứa:



Mỗi phản ứng oxy hóa-khử của các phản ứng oxy hóa-khử được mô tả nêu trên có thể đảo ngược được, và vì vậy các hợp chất có thể được sử dụng ở trạng thái oxy hóa cao hơn và có thể được khử khi trong vùng cảm biến kênh dẫn điện 31, hoặc có thể được sử dụng ở trạng thái oxy hóa thấp hơn và có thể được oxy hóa khi trong vùng cảm biến kênh dẫn điện 31.

Như được đề cập ở trên, thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử 18 được đề cập ở đây có thể là trung hòa hoặc gần trung hòa trong dung dịch, và không mang điện tích lớn hơn cho tới khi nó tham gia phản ứng oxy hóa-khử. Như vậy, các nucleotit được đánh dấu 10 trong dung dịch không được xem là các phân tử mang điện tích cao, và sự tích tụ giữa các nucleotit được đánh dấu 10 mang điện tích đối nhau (các thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử 18 gần trung hòa có điện tích đối nhau 18) ít có khả năng xảy ra.

Các nucleotit được đánh dấu 10 có thể được sử dụng trong bộ kit và/hoặc trong hệ thống 30 (ví dụ về của hệ thống được thể hiện trên Fig. 2). Bộ kit hoặc hệ thống 30 có thể chứa kênh dẫn điện 32. Kênh dẫn điện 32 có thể nằm trong hoặc là phần của đồ chứa, như là giếng, ống, máng, cuvet, đĩa Petri, chai, hoặc đồ chứa tương tự. Ví dụ khác về đồ chứa thích hợp là tế bào chảy 34. Cấu hình tế bào chảy bất kỳ thích hợp cho các việc thực hiện được mô tả trong đây có thể được sử dụng. Một số tế bào chảy ví dụ là những tế bào chảy có mặt trên thị trường từ Illumina, Inc. (San Diego, CA). Các tế bào chảy 34 là thuận tiện cho việc vận chuyển các chất phản ứng lớn đến chip của các kênh dẫn điện khả định riêng rẽ 32 trong suốt quá trình gắn của các thành phần phản ứng (ví dụ, các axit nucleic khuôn, các nucleotit được đánh dấu 10, v.v) vào các kênh dẫn điện 32 tương ứng hoặc trong suốt các phản ứng tiếp theo được thực hiện với các thành phần phản ứng trên các kênh dẫn điện 32 tương ứng. Các quy trình có chu kỳ, như là các phản ứng giải trình tự axit nucleic, là đặc biệt thích hợp cho các tế bào chảy 34. Đồ chứa khác đặc biệt hữu ích là giếng trong đĩa đa giếng hoặc đĩa vi mạch.

Trong ví dụ được thể hiện trên Fig. 2, tế bào chảy 34 chứa kênh dẫn điện 32. Như được sử dụng trong đây, thuật ngữ “kênh dẫn điện” có mục đích mang nghĩa là phần của thiết bị dò mà biến đổi sự nhiễu tại bề mặt của nó hoặc trong trường điện xung quanh nó thành tín hiệu điện. Ví dụ, kênh dẫn điện 32 có thể biến đổi sự đến hoặc sự rời đi của thành phần phản ứng (ví dụ, nucleotit được đánh dấu 10) thành tín hiệu điện. Trong các ví dụ được đề cập trong đây, kênh dẫn điện 32 cũng có thể biến đổi các tương tác giữa hai thành phần phản ứng (axit nucleic khuôn và nucleotit 20 của nucleotit được đánh dấu 10) thành tín hiệu có thể dò được thông qua tương tác của nó với thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử 18 của nucleotit được đánh dấu 10.

Kênh dẫn điện 32 có thể là kênh của bộ cảm biến điện tích 35. Bộ cảm biến điện tích 35 có thể chứa các đầu nguồn và đầu bộ xả S, D và kênh 32 nối với các đầu S, D. Kênh 32 có thể có hình dạng thích hợp bất kỳ, như là, ví dụ, ống, dây, tấm, v.v.

Các đầu S, D có thể là vật liệu dẫn điện phù hợp bất kỳ. Các ví dụ về vật liệu của nguồn và bộ xả thích hợp bao gồm coban, coban silicua, niken, niken silicua, nhôm, vonfram, đồng, titan, molybden, indi thiếc oxit (indium tin oxide - ITO), indi kẽm oxit, vàng, bạch kim, cacbon, v.v.

Kênh dẫn điện 32 có thể chứa vật liệu dẫn điện hoặc vật liệu bán dẫn bất kỳ có thể oxy hóa hoặc khử thế điện tích hoạt tính oxy hóa-khử 18. Vật liệu có thể bao gồm vật liệu hữu cơ, vật liệu vô cơ, hoặc cả hai. Một số ví dụ về các vật liệu kênh thích hợp chứa silic, cacbon (ví dụ, cacbon thủy tinh, graphen, v.v), các polymer, như là các polymer dẫn điện (ví dụ, polypyrrol, polyanilin, polythiophen, poly(3,4-etylendioxythiophen) được pha thêm với poly(4-styrenesulfonat) (PEDOT-PSS), v.v), các kim loại, v.v

Trong một số ví dụ, kênh dẫn điện 26 cũng có thể là cấu trúc nano mà có ít nhất một chiều trên thang đo nano (lên xuống từ 1nm đến ít hơn 1 μ m). Trong một ví dụ, chiều này nói đến chiều lớn nhất. Như các ví dụ, kênh dẫn điện 26 có thể là cấu trúc nano bán dẫn, cấu trúc nano graphen, cấu trúc nano kim loại, và cấu trúc nano polyme dẫn điện. Cấu trúc nano có thể là ống nano đa hoặc đơn vách, dây nano, băng nano, v.v

Bộ cảm biến điện tích 35 ví dụ là tranzito hiệu ứng trường (field effect transistor - FET), như là FET dựa trên ống nano cacbon (carbon nanotube - CNT), FET dựa trên ống nano cacbon đơn vách (single-walled carbon nanotube - SWNT), FET của dây nano silic (SiNW), FET của dây nano polyme, FET của băng nano graphen (và các FET của băng nano liên quan được chế tạo từ các vật liệu 2D như là MoS₂, silicen, v.v), FET ống (tunnel FET - TFET), và các thiết bị độ dốc dưới ngưỡng đứng.

Bộ cảm biến điện tích 35 ví dụ được thể hiện trên Fig. 2 là FET cấu trúc nano chứa nguồn S, bộ xả D, và kênh dẫn điện 32 giữa nguồn S và bộ xả D. Kênh dẫn điện 32 có thể là ống nano cacbon, ống nano cacbon đơn vách, dây nano silic, dây nano polyme, v.v. Kênh dẫn điện 32 hoạt động như là tận cùng cổng (gate), và vì vậy cũng được thể hiện như là “G” trên Fig. 2. Trong các ví dụ được đề cập trong đây, cổng G/kênh dẫn điện 32

có thể hoạt động như là điện cực oxy hóa-khử (cung cấp hoặc nhận các electron) cho thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử 18 của nucleotit được đánh dấu 10. Cụ thể hơn, cổng G/kênh dẫn điện 32 có thể được sử dụng để truyền các electron đến hoặc từ thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử 18. Truyền electron có thể xảy ra thông qua sự xuyên ống thông qua oxit cổng (không được thể hiện trên hình vẽ) trên ít nhất phần của bề mặt của cổng G/kênh dẫn điện 32. Trong một số ví dụ, độ dày của oxit cổng có thể được sử dụng để điều biến hiệu quả chuyển dòng điện sao cho lượng thời gian tương tác tối thiểu trôi qua trước khi thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử 18 trở nên được hoạt hóa đủ. Thời gian tương tác có thể liên quan đến thời gian mà thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử 18 được giữ bên trong vùng đủ gần của cổng G/kênh dẫn điện 32 cho sự truyền electron xảy ra với khả năng xảy ra cao. Khoảng thời gian này sẽ phụ thuộc vào nhiều yếu tố, bao gồm loại thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử 18, độ dày oxit cổng, và khoảng cách của thẻ điện tích 18 từ cổng G/kênh dẫn điện 32. Điều này có thể được sử dụng để đảm bảo là bộ cảm biến điện tích 35 đủ phân biệt giữa các nucleotit được đánh dấu 10 đang phân tán mà tiếp xúc ngắn ngủi với cổng G/kênh dẫn điện 32 nhưng không thực sự được kết hợp với polymeraza 26 được gắn vào cổng G/kênh dẫn điện 32. Các nucleotit 10 được kết hợp với vị trí hoạt động của polymeraza 26 được mong đợi là còn giữ nguyên ở trạng thái được kết hợp trong khoảng thời gian mà dài hơn đáng kể thời gian mà sự tương tác ngắn ngủi xảy ra. Ví dụ, nucleotit được đánh dấu 10 có thể giữ nguyên được kết hợp với vị trí hoạt động của polymeraza (ví dụ, polymeraza 26) trong hàng trăm micro giây đến hàng trăm mili giây. Sự tương tác ngắn ngủi sẽ xảy ra nhanh hơn trên các thang thời gian phân tán là các cấp khuếch đại.

Trong ví dụ này, polymeraza 26 được giữ cố định trên cổng G/kênh dẫn điện 32 của bộ cảm biến điện tích 32 với phân tử nối 28. Phân tử nối 28 được sử dụng như là mỏ neo cho polymeraza 26. Phân tử nối 28 có thể biểu hiện khả năng vận chuyển electron. Các ví dụ về các phân tử khối 28 thích hợp chứa các chuỗi axit nucleic (ví dụ, có từ 5 đến 25 nucleotit), các peptit, các chuỗi cacbon đơn, các oligome hoặc các polyme không dẫn điện hoặc dẫn điện thấp, v.v

Trong một số ví dụ, phân tử nối 28 giữ polymeraza 26 ít nhất 10 nm tính từ cổng G/kênh dẫn điện 32 của bộ cảm biến điện tích 35. Điều này có thể là đáng mong đợi, vì

dụ, khi không đáng mong đợi để cảm biến các điện tích của polymeraza 26 và/hoặc các điện tích âm của axit nucleic khuôn 36 được giữ bởi polymeraza 26. Tuy nhiên, nếu là đáng mong đợi để cảm biến các điện tích của polymeraza 26 và/hoặc axit nucleic khuôn 36, thì phân tử nối 28 có thể giữ polymeraza 26 ít hơn khoảng 10 nm, ít hơn khoảng 9 nm, ít hơn khoảng 8 nm, ít hơn khoảng 7 nm, ít hơn khoảng 6 nm, ít hơn khoảng 5 nm, ít hơn khoảng 4 nm, ít hơn khoảng 3 nm, ít hơn khoảng 2 nm, hoặc khoảng 1 nm từ cổng G của bộ cảm biến điện tích 32.

Việc sử dụng bộ cảm biến điện tích 35 dựa trên FET có thể tạo khả năng cho điều sau đây: (1) độ nhạy đơn phân tử có thể đạt được với FET được thiết kế hợp lý, và (2) mức song song hóa (cũng được gọi là “khả năng đa thành phần”) cao có thể được đơn giản hóa khi sự thay đổi điện tích được dò được xác định vị trí trong vùng lân cận của cổng G/kênh dẫn điện 32, bằng cách đó tránh được sự trao đổi chéo giữa vùng lân cận, các vị trí FET khả định riêng rẽ (ví dụ, trong chip). Ngoài ra, FET cấu trúc nano silicon có thể được sản xuất sử dụng các quy trình tương hợp với các phương tiện sản xuất bán dẫn.

Các ví dụ về bộ kit và/hoặc hệ thống 30 cũng có thể bao gồm axit nucleic khuôn 36 được đưa vào tế bào chảy 34 và các chất phản ứng (không được thể hiện trên Fig. 2) được đưa vào tế bào chảy 34.

Axit nucleic khuôn 36 có thể là mẫu bất kỳ để được giải trình tự, và có thể bao gồm ADN, ARN, hoặc các chất tương tự của chúng. Nguồn của các axit nucleic khuôn (hoặc đích) 36 có thể là ADN hệ gen, ARN thông tin, hoặc các axit nucleic khác từ các nguồn tự nhiên. Trong một số trường hợp, các axit nucleic khuôn 36 bắt nguồn từ các nguồn này có thể được khuếch đại trước khi được sử dụng trong phương pháp hoặc hệ thống 30 theo sáng chế. Một số trong số nhiều kỹ thuật khuếch đại đã biết có thể được sử dụng bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, phản ứng chuỗi polymeraza (polymerase chain reaction - PCR), khuếch đại kiểu vòng tròn lăn (rolling circle amplification - RCA), khuếch đại đa thay thế (multiple displacement amplification - MDA), hoặc khuếch đại ngẫu nhiên (random primer amplification - RPA). Được hiểu là việc khuếch đại các axit nucleic đích 26 trước khi sử dụng trong phương pháp hoặc hệ thống 30 được thiết lập trước trong đây là không bắt buộc. Khi đó, các axit nucleic khuôn 36 sẽ không được

khuếch đại trước khi sử dụng trong một số ví dụ. Các axit nucleic khuôn/đích có thể tùy ý được bắt nguồn từ các thư viện tổng hợp. Các axit nucleic tổng hợp có thể có các thành phần ADN hoặc ARN tự nhiên hoặc có thể là các chất tương tự của chúng.

Các mẫu sinh học từ nơi mà các axit nucleic khuôn 36 có thể được lấy bao gồm, ví dụ, các sinh vật từ động vật có vú, như là loài gặm nhấm, chuột nhắt, chuột cống, thỏ, chuột lang, động vật móng guốc, ngựa, cừu, lợn, dê, bò, mèo, chó, động vật linh trưởng, động vật linh trưởng là người hoặc không phải người; thực vật như là *Arabidopsis thaliana*, ngô, cao lương, yến mạch, lúa mì, lúa gạo, cải dầu, hoặc đậu nành; tảo như là *Chlamydomonas reinhardtii*; giun tròn như là *Caenorhabditis elegans*; côn trùng như là *Drosophila melanogaster*, muỗi, ruồi giấm, ong mật hoặc nhện; cá như là cá ngựa vằn; động vật bò sát; động vật lưỡng cư như là ếch hoặc *Xenopus laevis*; *dictyostelium discoideum*; nấm như là *pneumocystis carinii*, *Takifugu rubripes*, nấm men, *Saccharomyces cerevisiae* hoặc *Schizosaccharomyces pombe*; hoặc ký sinh trùng sốt rét. Các axit nucleic khuôn 36 cũng có thể được bắt nguồn từ các sinh vật nhân sơ như là vi khuẩn, *Escherichia coli*, *staphylococci* hoặc *mycoplasma pneumoniae*; vi khuẩn cổ; virus như là virus Hepatitis C, virus ebola hoặc virus gây suy giảm miễn dịch ở người; hoặc viroid. Các axit nucleic khuôn 36 có thể được bắt nguồn từ sự nuôi cấy đồng nhất hoặc quần thể của các loài sinh vật trên hoặc còn từ tập hợp của nhiều loài sinh vật khác nhau, ví dụ, trong cộng đồng hoặc hệ sinh thái.

Ngoài ra, các axit nucleic khuôn/đích 36 có thể không được bắt nguồn từ các nguồn tự nhiên, mà còn có thể được tổng hợp sử dụng các kỹ thuật đã biết. Ví dụ, các đầu dò biểu hiện gen hoặc các đầu dò xác định kiểu gen có thể được tổng hợp và được sử dụng trong các ví dụ được thiết lập trước trong đây.

Trong một số ví dụ, các axit nucleic khuôn/đích 36 có thể thu được như là các đoạn của một hoặc nhiều axit nucleic lớn hơn. Sự phân đoạn có thể được thực hiện sử dụng một số trong số nhiều kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này bao gồm, ví dụ, khí dung hóa, nghiền bằng sóng âm, cắt hóa học, cắt bằng enzym, hoặc cắt xén vật lý. Sự phân đoạn cũng có thể nhờ sử dụng kỹ thuật khuếch đại cụ thể mà tạo ra các sản phẩm khuếch đại bằng cách sao chép chỉ phần axit nucleic lớn hơn. Ví dụ, phản ứng khuếch đại PCR

tạo ra các đoạn có kích thước được xác định bằng chiều dài của trình tự nucleotit trên khuôn mẫu gốc mà nó ở giữa các vị trí tại đó các mối sườn lai trong suốt quá trình khuếch đại.

Tập hợp các axit nucleic khuôn/đích 36, hoặc các sản phẩm khuếch đại của chúng, có thể có độ dài sợi trung bình là như mong đợi hoặc thích hợp cho ứng dụng cụ thể của các phương pháp, các bộ kit, hoặc hệ thống 30 được thiết lập trước trong đây. Ví dụ, độ dài sợi trung bình có thể là ít hơn khoảng 100.000 nucleotit, 50.000 nucleotit, 10.000 nucleotit, 5.000 nucleotit, 1.000 nucleotit, 500 nucleotit, 100 nucleotit, hoặc 50 nucleotit. Thay vào đó hoặc ngoài ra, độ dài sợi trung bình có thể lớn hơn khoảng 10 nucleotit, 50 nucleotit, 100 nucleotit, 500 nucleotit, 1.000 nucleotit, 5.000 nucleotit, 10.000 nucleotit, 50.000 nucleotit, hoặc 100.000 nucleotit. Độ dài sợi trung bình cho tập hợp các axit nucleic đích, hoặc các sản phẩm khuếch đại của chúng, có thể nằm trong khoảng giữa giá trị tối đa và tối thiểu được thiết lập từ trước ở trên.

Trong một số trường hợp, tập hợp các axit nucleic khuôn/đích 36 có thể được tạo ra dưới các điều kiện hoặc nếu không thì được tạo cấu hình để có độ dài tối đa cho các phần tử của nó. Ví dụ, độ dài tối đa cho các phần tử có thể là ít hơn khoảng 100.000 nucleotit, 50.000 nucleotit, 10.000 nucleotit, 5.000 nucleotit, 1.000 nucleotit, 500 nucleotit, 100 nucleotit hoặc 50 nucleotit. Thay vào đó hoặc ngoài ra, tập hợp các axit nucleic khuôn 36, hoặc các sản phẩm khuếch đại của chúng, có thể được tạo ra dưới các điều kiện hoặc nếu không thì được tạo cấu hình để có độ dài tối thiểu cho các phần tử của nó. Ví dụ, độ dài tối thiểu cho các phần tử có thể dài hơn khoảng 10 nucleotit, 50 nucleotit, 100 nucleotit, 500 nucleotit, 1.000 nucleotit, 5.000 nucleotit, 10.000 nucleotit, 50.000 nucleotit, hoặc 100.000 nucleotit. Độ dài sợi tối đa và tối thiểu cho các axit nucleic khuôn 36 trong tập hợp có thể nằm trong khoảng giữa giá trị tối đa và tối thiểu được thiết lập từ trước ở trên.

Như được thể hiện trên Fig. 2, axit nucleic khuôn 36 (ví dụ, sợi ADN sợi đơn) dễ được giải trình tự được liên kết với polymeraza 26 sau khi đã được đưa vào chất lỏng cùng với hoặc phân tách với các chất phản ứng, như là các nucleotit được đánh dấu 10 (không được thể hiện trên Fig. 2) đã được mô tả trước đó.

Axit nucleic khuôn 36 và/hoặc các chất phản ứng (ví dụ, các nucleotit được đánh dấu 10) có thể có mặt trong chất lỏng và được đưa vào tế bào chảy 34. Chất lỏng có thể bao gồm dung dịch đệm có nồng độ muối thấp. Như các ví dụ, dung dịch đệm có nồng độ muối thấp có thể chứa muối từ nhiều hơn 0 mM đến gần 50 mM. Như một ví dụ, dung dịch đệm có nồng độ muối thấp có thể chứa đến 5 mM Mg^{2+} trong đệm Tris (pH 8,0). Việc sử dụng dung dịch đệm có nồng độ muối thấp có thể là đáng mong đợi sao cho vùng cảm biến 31 (tức là, chiều dài Debye) không bị ảnh hưởng bất lợi, tức là, không quá dài để ngăn ngừa sự cảm biến của các thẻ điện tích 18. Chất lỏng cũng có thể chứa các chất xúc tác, như là các enzym, mà dễ dàng hóa phản ứng, các chất phụ gia khác, và các dung môi (ví dụ, nước, dimethyl sulfoxit (dimethyl sulfoxide - DMSO), betain, formamit, v.v).

Trong một số ví dụ, nhiều nucleotit được đánh dấu 10 khác nhau có thể được sử dụng cùng nhau trong chất lỏng mà được đưa vào bộ cảm biến điện tích 35. Trong các ví dụ này, được hiểu là phân tử liên kết 14, 14' có thể hoặc giống nhau cho tất cả các loại nucleotit được đánh dấu, hoặc có thể khác nhau. Các tính chất của phân tử liên kết 14, 14', như là độ dài và độ cứng, có thể được thay đổi sao cho ảnh hưởng đến tốc độ của phản ứng oxy hóa-khử. Các tính chất này có thể được điều chỉnh một cách riêng rẽ cho nucleotit được đánh dấu 10 và thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử 18 được kết hợp của nó. Các tính chất của vùng đặc hiệu 24 của phân tử liên kết 14' cũng có thể được thay đổi để ảnh hưởng tốc độ của phản ứng oxy hóa-khử. Phân tử liên kết 14, 14' có thể được thay đổi để tăng hoặc giảm lượng thời gian mà thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử 18 ở trong vùng lân cận với kênh dẫn điện 32. Các thay đổi này có thể được sử dụng để làm ảnh hưởng tốc độ truyền electron. Làm như vậy, các tương tác ngăn ngừa giữa thẻ điện tích 18 và kênh dẫn điện 32 từ các nucleotit được đánh dấu 10 đang phân tán có thể được làm cho ít có xu hướng gây ra sự truyền electron. Ngoài ra, việc giữ thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử 18 trong thời gian lâu hơn trong vùng lân cận gần kênh dẫn điện 32 có thể gây ra khả năng cao hơn của việc truyền electron.

Trong một ví dụ, bốn nucleotit được đánh dấu 10 khác nhau được sử dụng trong chất lỏng mà được đưa vào bộ cảm biến điện tích 35, mỗi bộ chứa nucleotit 12 khác nhau (cụ thể là bazơ 20 khác nhau) và thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử đặc hiệu nucleotit 18 khác nhau. Ví dụ về điều này được thể hiện trên Fig. 3. Trong ví dụ này, các nucleotit

được đánh dấu 10 bao gồm: nucleotit được đánh dấu thứ nhất 10A chứa deoxyadenosin polyphosphat làm nucleotit và thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử đặc hiệu nucleotit thứ nhất (được thể hiện với bốn điện tích dương trên Fig. 3); nucleotit được đánh dấu thứ hai 10G chứa deoxyguanosin polyphosphat làm nucleotit và thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử đặc hiệu nucleotit thứ hai (được thể hiện với bốn điện tích âm trên Fig. 3); nucleotit được đánh dấu thứ ba 10C chứa deoxycytidin polyphosphat làm nucleotit và thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử đặc hiệu nucleotit thứ ba (được thể hiện với hai điện tích âm trên Fig. 3); và nucleotit được đánh dấu thứ tư 10T chứa deoxythymidin polyphosphat làm nucleotit và thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử đặc hiệu nucleotit thứ tư (được thể hiện với một điện tích dương trên Fig. 3). Trong ví dụ này, các thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử đặc hiệu nucleotit thứ nhất, thứ hai, thứ ba và thứ tư là khác nhau.

Trong ví dụ được thể hiện trên Fig. 3, hai thẻ của các thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử đặc hiệu nucleotit thứ nhất, thứ hai, thứ ba và thứ tư mang điện tích dương (ví dụ, dATP và dTTP) ở trạng thái điện tích đã thay đổi (tức là, thay đổi phản ứng oxy hóa-khử xảy ra), và hai thẻ còn lại của các thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử đặc hiệu nucleotit thứ nhất, thứ hai, thứ ba và thứ tư (ví dụ, dGTP và dCTP) mang điện tích âm ở trạng thái điện tích đã thay đổi (tức là, thay đổi phản ứng oxy hóa-khử xảy ra).

Trong ví dụ được thể hiện trên Fig. 3, mặc dù các điện tích trên hai thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử đặc hiệu cho các nucleotit là giống nhau (dương hoặc âm), các thẻ 18 vẫn có thể được sử dụng để phân biệt các loại nucleotit khác nhau bởi vì các điện tích có các độ bền khác nhau (ví dụ, sau khi hoạt hóa oxy hóa-khử). Cấu hình ví dụ được thể hiện trên Fig. 3 đề xuất sự phân biệt bốn trạng thái dựa trên vị trí lai phân tử nội đơn và bốn thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử 18 khác nhau. Cụ thể, cả hai dGTP và dCTP đều chứa các thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử 18 mang điện tích âm mà phân biệt chúng với dATP và dTTP; và dGTP có thể được phân biệt với dCTP nhờ vào điện tích cao hơn một cách đáng kể điện tích trên dCTP. Tương tự, dATP và dTTP có thể được phân biệt khỏi nhau nhờ vào điện tích dương cao hơn trên phần phân tử dATP so với phần phân tử dTTP.

Trong một số ví dụ, có thể không khả thi để có các thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử 18 với cả hai cường độ dương và âm hoạt động trong cùng chất lỏng, bởi vì điện áp được yêu cầu để nạp điện thẻ âm có thể xả điện tích thẻ dương, và ngược lại. Khi đó, trong các ví dụ khác, nó có thể là đáng mong đợi để sử dụng các ví dụ về các nucleotit được đánh dấu 10 được đề cập trong đây mà chứa các thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử 18 của một chiều phân cực, và để sử dụng các nucleotit được đánh dấu khác mà mang các thẻ điện tích vĩnh cửu (tức là không oxy hóa-khử). Các ví dụ về các thẻ điện tích vĩnh cửu chứa các thẻ điện tích âm như là, ví dụ, nhóm phosphat, DMT và/hoặc FMOC; hoặc các thẻ điện tích dương, như là amin sơ cấp. Như là ví dụ, từ một đến ba nucleotit được đánh dấu 10 khác nhau (chứa các thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử 18) có thể được sử dụng, và phần còn lại của các nucleotit được đánh dấu sẽ chứa các thẻ điện tích vĩnh cửu và không phải các thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử 18. Điều này đặc biệt hữu ích trong trường hợp mà các điều kiện khử hoặc oxy hóa (nhưng không phải cả hai) được sử dụng. Được hiểu là sự tích tụ không cần xảy ra trong các trường hợp này, bởi vì không có nồng độ tương đối cao của các phần phân tử lớn của cả hai loại điện tích trong dung dịch tại cùng thời điểm.

Fig. 3 cũng minh họa vùng cảm biến 31 (vùng bóng mờ xung quanh cổng G/kênh dẫn điện 32). Các bộ cảm biến điện tích 35 có thể được hoạt động ở các nồng độ muối thích hợp về mặt sinh học, ví dụ, trong phạm vi từ khoảng 1 mM đến khoảng 100 mM. Độ dài sàng lọc Debye của các dung dịch muối này có thể trong phạm vi từ khoảng 0,3 nm đến khoảng 10 nm, có thể giới hạn vùng cảm biến 31 đến vài nm bên ngoài bề mặt của cổng G và thường có thể giảm các mức tín hiệu đến giới hạn của khả năng dò được.

Trong khi các polymeraza 28 được nối được thể hiện trên kênh dẫn điện 32 trên Fig. 3, được hiểu là trong bộ cảm biến điện tích 35 cụ thể, một polymeraza 28 được nối với một kênh dẫn điện 32. Khi đó, ví dụ được thể hiện trên Fig. 3 minh họa polymeraza 28 trong suốt các sự kiện hợp nhất bốn nucleotit khác nhau, và ảnh hưởng lên các thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử 18 khác nhau trong suốt các sự kiện hợp nhất tương ứng.

Tham khảo đến Fig. 4, ví dụ về phương pháp được mô tả. Phương pháp 100 bao gồm việc đưa axit nucleic khuôn 36 vào kênh dẫn điện 32 có polymeraza 26 được nối

thêm vào đó (số chỉ dẫn 102); việc đưa các nucleotit được đánh dấu 10 đến kênh dẫn điện 32, ít nhất một trong số các nucleotit được đánh dấu 10 chứa nucleotit 12 và thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử đặc hiệu nucleotit 18 được gắn thêm vào đó, nhờ đó một trong số các nucleotit được đánh dấu 10 kết hợp với polymeraza 26 (số chỉ dẫn 104); trong khi một trong số các nucleotit được đánh dấu 10 được kết hợp, bắt đầu phản ứng oxy hóa-khử giữa thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử đặc hiệu nucleotit 18 và kênh dẫn điện 32 để thay đổi trạng thái điện tích của thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử đặc hiệu nucleotit 18 (số chỉ dẫn 106); và trong đáp ứng với phản ứng oxy hóa-khử, phát hiện đáp ứng của bộ cảm biến điện tích 32 (số chỉ dẫn 108). Các Fig. 5A và 5B cũng sẽ được tham khảo thông qua phần thảo luận của phương pháp 100.

Như được thể hiện trên Fig. 5A, axit nucleic khuôn 36 được đưa vào bộ cảm biến điện tích 32 có thể được giữ tại chỗ gần polymeraza 26, được nối với bộ cảm biến điện tích 32. Axit nucleic khuôn 36 được thể hiện trên Fig. 5A có thể là sợi khuôn mẫu ADN.

Cũng như được thể hiện trên Fig. 5A, nucleotit được đánh dấu 10 có thể chứa bazơ 20 mà được bổ sung với axit nucleic đích của axit nucleic khuôn 36. Nucleotit được đánh dấu 10 sẽ được giữ tại chỗ, trong phần, gần polymeraza 26 cũng được liên kết với axit nucleic khuôn 36. Nếu có mặt, vùng đặc hiệu 24 của phân tử liên kết 14' của nucleotit được đánh dấu 10 có thể tương tác với phân tử nối 28.

Ví dụ về nucleotit được đánh dấu 10 được kết hợp với phân tử nối 28 được thể hiện trên Fig. 5B. Trong ví dụ này, phân tử liên kết 14' của nucleotit được đánh dấu 10 chứa vùng đặc hiệu 24 (ví dụ, A', B', C') có ái lực cho phần (ví dụ, A, B, C) của phân tử nối 28. Trong ví dụ cụ thể này, vùng đặc hiệu 24 (ví dụ, A', B', C') chứa các nucleotit hoặc các axit peptit nucleic mà bổ sung với các nucleotit hoặc các axit peptit nucleic của phần (ví dụ, A, B, C) của phân tử nối 28. Trong ví dụ khác, vùng đặc hiệu 24 và vùng nhận của phân tử nối 28 có thể là các phần phân tử không phải axit nucleic mà có ái lực với nhau. Trong ví dụ khác, vùng đặc hiệu 24 có thể là phần phân tử không phải axit nucleic mà có ái lực cho polymer kị nước (một ví dụ về phân tử nối 28). Liên kết đặc hiệu giữa các vùng này có thể do bắt cặp bazơ Watson-Crick tiêu chuẩn. Vùng đặc hiệu 24, trong ví dụ này, cũng có thể chứa các inosin (I) bên sườn trình tự nucleotit A', B', C'. Các inosin là các

bazơ phổ quát, và vì vậy có thể bắt cặp với tất cả bốn nucleotit tự nhiên của ADN. Khi đó, các tương tác liên kết thêm có thể do các tương tác của các bazơ phổ quát (ví dụ, inosin I) với các nucleotit tự nhiên trên phân tử nối 28. Vì vậy, khi nucleotit được đánh dấu 10 được nối với polymeraza 26 trong suốt sự hợp nhất, liên kết hợp lực tạo ra giữa vùng đặc hiệu 24 của nucleotit được đánh dấu 10 và phân tử nối 28, mà làm tăng một cách đáng kể độ ổn định của sự tương tác giữa nucleotit được đánh dấu 10 và phân tử nối 28.

Khi phân tử liên kết 14 của nucleotit được đánh dấu 10 không chứa vùng đặc hiệu 24, được hiểu là nucleotit được đánh dấu 10 sẽ được giữ tại chỗ nhờ sự tương tác với polymeraza 26. Độ dài của phân tử liên kết 14 có thể giúp đảm bảo là thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử 18 được giữ trong vùng cảm biến 31 của cổng G/kênh dẫn điện 32.

Sự tương tác giữa nucleotit được đánh dấu 10 và polymeraza 26, hoặc giữa nucleotit được đánh dấu 10 và polymeraza 26 và phân tử nối 28 khiến thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử 18 đi vào trong vùng cảm biến 31 của kênh dẫn điện 32. (Các) sự tương tác cũng giúp duy trì thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử 18 trong vùng cảm biến 31 trong thời gian đủ cho truyền điện tích hiệu quả và hoàn toàn. Thời gian này có thể là lên đến mười mili giây. Tương tác tương đối dài này là không giống các nucleotit được đánh dấu khác 10 có mặt trong dung dịch, có thể phân tán và chạm nhanh kênh dẫn điện 32. Tương tác ngắn này không đủ dài cho sự truyền đủ điện tích xảy ra, và vì vậy trong các trường hợp này, thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử 18 không mang điện tích và không có đáp ứng được dò bởi bộ cảm biến điện tích 32.

Trong ví dụ được thể hiện trên Fig. 5A, thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử 18 làm từ đồng phtaloxyanin của nucleotit được đánh dấu đi vào trường (ví dụ, vùng cảm biến 31) mà nằm trong từ khoảng 1 nm đến khoảng 2 nm của kênh dẫn điện 32. Bởi vì nucleotit được đánh dấu 10 được giữ tại chỗ, thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử 18 ở trong vị trí để mang điện tích nhờ cổng G/kênh dẫn điện 32.

Để bắt đầu phản ứng oxy hóa-khử giữa cổng G/kênh dẫn điện 32 (ví dụ, dây nano silic, ống nano cacbon, v.v) và thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử 18, điện áp được nạp vào cổng G/kênh dẫn điện 32 có thể được điều chỉnh đến điện áp oxy hóa hoặc điện áp khử của thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử 18. Khi được oxy hóa, thẻ điện tích hoạt tính

oxy hóa-khử 18 mất các electron, và vì vậy cổng G/kênh dẫn điện 32 tạo ra các điện tích dương tổng thể cho thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử 18. Khi được khử, thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử 18 thêm các electron, và vì vậy cổng G/kênh dẫn điện 32 đưa các điện tích âm tổng thể vào thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử 18. Như là kết quả của phản ứng oxy hóa-khử, trạng thái điện tích của thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử 18 được thay đổi. Trạng thái mang điện tích cao được thay đổi này (ví dụ, so với trạng thái của thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử 18 trước khi mang điện tích, là trạng thái không được oxy hóa hoặc không được khử) làm nhiễu trường xung quanh kênh dẫn điện 32 và tạo ra tín hiệu có thể dò.

Điện áp được nạp vào kênh dẫn điện 32 trong suốt phản ứng oxy hóa-khử và trong suốt sự dò có thể phụ thuộc vào thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử 18 được sử dụng. Ví dụ, điện áp được nạp có thể khác với điện áp đọc, và vì vậy kênh dẫn điện 32 có thể quay tròn theo chu kỳ giữa (các) điện áp được nạp và (các) điện áp đọc. Trong ví dụ, việc bắt đầu phản ứng oxy hóa-khử bao gồm việc nạp điện áp tải đến kênh dẫn điện 32, và phát hiện đáp ứng của kênh dẫn điện 32 bao gồm việc nạp điện áp đọc đến kênh dẫn điện 32.

Đáp ứng của kênh dẫn điện 32 sau phản ứng oxy hóa-khử là chỉ thị của trạng thái điện tích được thay đổi của thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử 18. Đáp ứng của kênh dẫn điện 32 sau phản ứng oxy hóa-khử cũng có thể là chỉ thị của bazơ 20 của nucleotit được đánh dấu 10 bởi vì thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử 18 là đặc hiệu nucleotit (tức là, thẻ 18 đặc hiệu được chọn lọc cho bazơ 20 đặc hiệu). Khi đó, phương pháp 100 cũng có thể bao gồm việc kết hợp đáp ứng của kênh dẫn điện 32 với thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử đặc hiệu nucleotit 18 của một trong số các nucleotit được đánh dấu được kết hợp 10 (tức là, nucleotit được đánh dấu 10 đã được liên hợp với polymeraza 26), và dựa trên thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử đặc hiệu nucleotit 18, xác định nucleotit (ví dụ, bazơ 20) của nucleotit được đánh dấu được kết hợp 10 (tức là, nucleotit được đánh dấu 10 đã được liên hợp với polymeraza 26).

Bazơ 20 của nucleotit được đánh dấu được kết hợp 10 sẽ được hợp nhất vào mạch mới 38 mà được lai với axit nucleic khuôn 36. Điều này sẽ, lần lượt, phá vỡ một cách tự nhiên liên kết giữa nhóm phosphat 16 của nucleotit được đánh dấu 10 và nucleotit bazơ

20 mới được hợp nhất. Ví dụ, sau sự hợp nhất của nucleotit bazơ 20 vào mạch mới 38, liên kết giữa phosphat alpha và phân tử liên kết 16 hoặc giữa phosphat alpha và phosphat beta được cắt một cách tự nhiên. Kết quả là, phần còn lại của nucleotit được đánh dấu 10 (ví dụ, các thành phần 14 hoặc 14' và 18) là tự do để phân ly từ nucleotit bazơ 20 và phân tán ra từ kênh dẫn điện 32, bằng cách đó phục hồi trường xung quanh kênh dẫn điện 32 về trạng thái nó ở đó trước khi liên hợp nucleotit được đánh dấu 10 với polymeraza 26. Sự xuất hiện và biến mất của các tín hiệu như là trường xung quanh kênh dẫn điện 32 bị nhiễu và được quay về trạng thái không nhiễu, một cách tương ứng, có thể tương ứng với sự hợp nhất của nucleotit bazơ 20 vào mạch mới 38 của axit nucleic khuôn 36. Khi đó, các ví dụ của phương pháp 100 cũng chứa việc cắt (ví dụ, tại nhóm phosphat 16) thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử đặc hiệu nucleotit 18 và phân tử liên kết 14, 14' từ một trong số các nucleotit được đánh dấu được kết hợp 10, nhờ đó nucleotit bazơ 20 của nucleotit được đánh dấu được kết hợp 10 được hợp nhất vào mạch mới 38 bổ sung với axit nucleic khuôn 36. Việc cắt có thể bao gồm đợi việc cắt tự nhiên xảy ra. Khi tín hiệu quay lại về trạng thái đường cơ sở giữa các sự hợp nhất thành công bazơ 20 của nucleotit được đánh dấu, phát hiện các đoạn polymer đồng nhất trong mạch mới 38 dọc theo sợi khuôn mẫu 36 là khả thi.

Một số ví dụ được đề cập ở đây tận dụng liên kết hợp lực của nucleotit được đánh dấu 10 với polymeraza 26, một mình hoặc trong sự kết hợp với phân tử nối 28, để mang và giữ thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử 18 ở gần vùng cảm biến 31 của kênh dẫn điện 32. Độ ổn định của phức hợp được tạo ra giữa phân tử nối 28 và vùng đặc hiệu 24 có thể tương đối thấp, vì vậy phức hợp này (giữa vùng đặc hiệu 24 và phân tử nối 28) không tạo ra cho các nucleotit được đánh dấu 10 mà cũng không được liên kết với polymeraza 26 (tức là, các nucleotit được đánh dấu 10 mà tự do trong dung dịch không về căn bản liên kết với phân tử nối 28). Nói cách khác, tỷ lệ tắt của phức hợp có thể cao đủ để thời gian tồn tại ngắn. Tuy nhiên, khi sự kết hợp ổn định được tạo ra giữa nucleotit được đánh dấu 10 và polymeraza 26, nồng độ cục bộ của phân tử liên kết 14, 14' tăng xung quanh phân tử nối 28, vì vậy dẫn đến tỷ lệ cao của vùng đặc hiệu 24 trên phân tử nối 28. Bằng cách này, thời gian kết hợp toàn cục được tăng lên đáng kể ở trạng thái kết hợp với polymeraza của nucleotit được đánh dấu 10 so với trạng thái không kết hợp của các nucleotit được

đánh dấu 10 trôi tự do. Hiệu ứng đồng vận của các ái lực của nucleotit được đánh dấu 10 cho polymeraza 30, một mình hoặc trong sự kết hợp với phân tử nối 28, cho phép ái lực liên kết tổng thể bền. Sau sự cắt tự nhiên bởi polymeraza 26 sau sự hợp nhất nucleotit bazơ 20, hiệu ứng đồng vận bị mất và thẻ điện tích 18 cũng sẽ phân tách từ kênh dẫn điện 32.

Trong phương pháp ví dụ 100, việc kết hợp của một trong số các nucleotit được đánh dấu 10 với polymeraza 28, việc bắt đầu phản ứng oxy hóa-khử, phát hiện, việc kết hợp của đáp ứng, và việc xác định nucleotit bazơ 20 được hợp nhất cùng nhau là chu kỳ giải trình tự. Phương pháp 100 còn có thể bao gồm việc thực hiện chu kỳ giải trình tự khác với nucleotit được đánh dấu 10 khác mà kết hợp với polymeraza 26. Thực hiện chu kỳ giải trình tự tiếp theo có thể bao gồm việc cho phép nucleotit được đánh dấu tiếp theo các nucleotit được đánh dấu 10 kết hợp với polymeraza 26; trong khi nucleotit được đánh dấu tiếp theo của các nucleotit được đánh dấu 10 được kết hợp, bắt đầu phản ứng oxy hóa-khử khác giữa thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử đặc hiệu nucleotit khác 18 và bộ cảm biến điện tích 32 để thay đổi trạng thái điện tích của thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử đặc hiệu nucleotit khác 18; trong đáp ứng với phản ứng oxy hóa-khử khác, xác định đáp ứng khác của bộ cảm biến điện tích 32; việc kết hợp đáp ứng khác của bộ cảm biến điện tích 32 với thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử đặc hiệu nucleotit khác; và dựa trên thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử đặc hiệu nucleotit khác 18, xác định nucleotit (bazơ 20) của nucleotit được đánh dấu tiếp theo của các nucleotit được đánh dấu 10 (tức là, nó đã được kết hợp với polymeraza 26). Thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử đặc hiệu nucleotit khác có thể được cắt, và nucleotit (bazơ 20) của nucleotit được đánh dấu tiếp theo của các nucleotit được đánh dấu 10 được hợp nhất vào mạch mới 38 bổ sung với axit nucleic khuôn 36. Chu kỳ giải trình tự có thể được lặp lại.

Trong các ví dụ được đề cập trong đây, dạng sóng cũng có thể được sử dụng. Dạng sóng có thể được giám sát để xác định khi nó đạt một hoặc nhiều hơn các điện áp ngưỡng cho điện thế oxy hóa-khử của các thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử 18 có các điện thế oxy hóa-khử khác nhau. Trong các trường hợp này, sự thay đổi trong dòng điện thu được thông qua cổng G/kênh dẫn điện 32 có thể được sử dụng như là thông tin để xác định

bazơ 20 của nucleotit được đánh dấu 10 chứa thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử 18 mà được kết hợp với điện áp ngưỡng cụ thể.

Trong các ví dụ được đề cập trong đây, số lượng các electron được truyền đến hoặc từ thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử 18 cũng có thể được giám sát. Số lượng được truyền của các electron có thể được sử dụng để xác định nucleotit bazơ 20 được kết hợp với polymeraza 26, và polymeraza 26 hợp nhất vào mạch mới 38.

Các nucleotit được đánh dấu 10 và hệ thống 30 được đề cập ở đây có thể được sử dụng cho một số trong số nhiều ứng dụng. Như được mô tả trong sự viện dẫn đến các Fig. 4, 5A và 5B, ứng dụng hữu ích cụ thể là việc giải trình tự axit nucleic, như là việc giải trình tự phân tử đơn bằng cách tổng hợp (sequencing-by-synthesis - SBS). Trong SBS đơn phân tử, việc mở rộng mỗi axit nucleic dọc theo axit nucleic khuôn 36 (ví dụ, axit nucleic đích hoặc sản phẩm khuếch đại của nó) được giám sát để xác định trình tự của các nucleotit trong khuôn mẫu 36. Quy trình hóa học cơ sở có thể là sự trùng hợp (ví dụ, khi được xúc tác bởi enzym polymeraza 26 như được mô tả trong đây). Trong ví dụ SBS phân tử đơn dựa trên polymeraza cụ thể, các nucleotit (ví dụ, các bazơ 20) được thêm vào mỗi (bằng cách đó mở rộng mỗi và tạo ra mạch mới 38) theo cách phụ thuộc khuôn mẫu sao cho phát hiện thứ tự và loại của các nucleotit được thêm vào mỗi có thể được sử dụng để xác định trình tự của khuôn mẫu. Nhiều khuôn mẫu 36 khác nhau tại các kênh dẫn điện 32 khác nhau của chip có thể là đối tượng của kỹ thuật SBS phân tử đơn dưới các điều kiện tại đó các sự kiện xảy ra cho các khuôn mẫu 36 khác nhau có thể được phân biệt bằng các bộ dò riêng rẽ mà hoạt động nối với mỗi kênh dẫn điện của các kênh dẫn điện 32. Mỗi kênh dẫn điện 32 (và các đầu nguồn và đầu bộ xả S, D của nó) có thể được đặt trong chỗ lõm hoặc giếng của tế bào chảy, giúp tách về mặt vật lý một kênh 32 khỏi kênh kề cận 32 trong chip.

Các ứng dụng thích hợp khác cho các nucleotit được đánh dấu 10, bộ kit, và hệ thống 30 được đề cập ở đây bao gồm giải trình tự bằng cách nối và giải trình tự bằng cách lai. Ứng dụng hữu ích khác cho các nucleotit được đánh dấu 10 và hệ thống 30 được đề cập ở đây là phân tích biểu hiện gen. Biểu hiện gen có thể được dò hoặc được định lượng sử dụng các kỹ thuật giải trình tự ARN, như là các kỹ thuật có liên hệ đến như là giải trình

tự ARN kỹ thuật số. Các kỹ thuật giải trình tự ARN có thể được thực hiện sử dụng các hệ phương pháp giải trình tự đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này như là các kỹ thuật được thiết lập từ trước ở trên ngoại trừ phát hiện huỳnh quang các nucleotit được đánh dấu về mặt quang học có thể được thay bằng các phương pháp dò dựa trên điện tích được thiết lập trước trong đây. Biểu hiện gen cũng có thể được dò hoặc được định lượng sử dụng các kỹ thuật lai được thực hiện bằng cách lai trực tiếp với chip hoặc sử dụng xét nghiệm đa công, các sản phẩm của chúng được dò trên chip. Các phương pháp này có thể sẵn sàng được làm thích ứng bằng cách thay thế phát hiện các dấu quang học và huỳnh quang bằng các kỹ thuật dò dựa trên điện tích, và các thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử 18 được thiết lập trước trong đây.

Cần được công nhận là tất cả các sự kết hợp của các khái niệm đã nói ở trên và các khái niệm bổ sung được thảo luận chi tiết hơn dưới đây (được đề xuất là các khái niệm này không mâu thuẫn với nhau) được dự tính như là phần của đối tượng yêu cầu bảo hộ được đề cập ở đây. Cụ thể, tất cả các sự kết hợp của đối tượng yêu cầu bảo hộ ở cuối sáng chế này được dự tính như là phần của đối tượng yêu cầu bảo hộ được đề cập ở đây. Cần được công nhận là hệ thống thuật ngữ rõ ràng được dùng trong đây cũng có thể xuất hiện trong bản mô tả bất kỳ được hợp nhất bằng cách viện dẫn đến cần được chấp nhận ý nghĩa nhất quán nhất với các khái niệm cụ thể được đề cập ở đây.

Viện dẫn trong suốt bản mô tả đến “một ví dụ”, “ví dụ khác”, “ví dụ”, và v.v, nghĩa là chi tiết cụ thể (ví dụ, dấu hiệu, cấu trúc, và/hoặc đặc trưng) được mô tả khi kết hợp với ví dụ được chứa trong ít nhất một ví dụ được mô tả trong đây, và có thể hoặc có thể không có mặt trong các ví dụ khác. Ngoài ra, được hiểu là các chi tiết được mô tả cho ví dụ bất kỳ có thể được kết hợp theo cách bất kỳ phù hợp trong nhiều ví dụ trừ phi ngữ cảnh rõ ràng biểu thị cái khác.

Các thuật ngữ “về căn bản” và “về” được sử dụng trong bản mô tả này, bao gồm các yêu cầu bảo hộ, được sử dụng để mô tả và giải thích cho các sự dao động nhỏ, như là do các sự thay đổi trong quy trình. Ví dụ, chúng có thể liên quan đến ít hơn hoặc bằng $\pm 5\%$, như là ít hơn hoặc bằng $\pm 2\%$, như là ít hơn hoặc bằng $\pm 1\%$, như là ít hơn hoặc bằng

$\pm 0,5\%$, như là ít hơn hoặc bằng $\pm 0,2\%$, như là ít hơn hoặc bằng $\pm 0,1\%$, như là ít hơn hoặc bằng $\pm 0,05\%$.

Ngoài ra, được hiểu là các phạm vi đề xuất trong đây chứa phạm vi đã định và giá trị bất kỳ hoặc các phạm vi con nằm trong phạm vi đã định, như thể giá trị hoặc phạm vi con này đã được chỉ định rõ ràng. Ví dụ, phạm vi được đại diện bởi từ khoảng 1 điện tích đến khoảng 100 điện tích, cần được giải thích là chứa không chỉ các giới hạn được chỉ định rõ ràng của từ khoảng 1 điện tích đến khoảng 100 điện tích, mà còn chứa các giá trị riêng lẻ, như là khoảng 5 điện tích, 50 điện tích, 75 điện tích, v.v, và các phạm vi con, như là từ khoảng 15 điện tích đến khoảng 85 điện tích, v.v

Trong khi nhiều ví dụ đã được mô tả chi tiết, được hiểu là các ví dụ được đề cập có thể được biến đổi. Vì vậy, phần mô tả đã được đề cập là được xem là không giới hạn.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Nucleotit được đánh dấu, bao gồm:

nucleotit;

phân tử liên kết được gắn vào nhóm phosphat của nucleotit; và

thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử được gắn vào phân tử liên kết, thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử được oxy hóa hoặc được khử bằng kênh dẫn điện khi được duy trì ở gần vùng cảm biến của kênh dẫn điện;

trong đó phân tử liên kết bao gồm chuỗi alkyl, nhóm amit, chuỗi poly(etylen glycol), và triazol.

2. Nucleotit được đánh dấu theo điểm 1, trong đó thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử chứa nguyên tử kim loại được tạo phức để tham gia phản ứng oxy hóa-khử.

3. Nucleotit được đánh dấu theo điểm 1 hoặc 2, trong đó phân tử liên kết bao gồm vùng đặc hiệu được gắn vào thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử.

4. Nucleotit được đánh dấu theo điểm 3, trong đó vùng đặc hiệu tương tác với vùng chất nhận trên phân tử nối được liên kết với kênh dẫn điện, và vùng đặc hiệu chứa thẻ ái lực.

5. Nucleotit được đánh dấu theo điểm 4, trong đó vùng đặc hiệu lai với vùng chất nhận trên phân tử nối được liên kết với kênh dẫn điện, và thẻ ái lực chứa trình tự nucleotit chứa từ một nucleotit đến mười nucleotit hoặc trình tự axit peptit nucleic chứa từ một axit peptit nucleic đến mười axit peptit nucleic.

6. Nucleotit được đánh dấu theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó:

thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử chứa 10 điện tích hoặc ít hơn ở trạng thái không được oxy hóa hoặc không được khử; và

thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử chứa từ 1 điện tích đến 100 điện tích ở trạng thái được oxy hóa hoặc được khử.

7. Nucleotit được đánh dấu theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó chuỗi alkyl gồm ít nhất 6 nguyên tử cacbon.

8. Nucleotit được đánh dấu theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó chuỗi poly(etylen glycol) gồm ít nhất 3 đơn vị etylen glycol.

9. Phương pháp giải trình tự axit nucleic bao gồm:

đưa axit nucleic khuôn vào kênh dẫn điện có polymeraza được nối thêm vào đó;

đưa các nucleotit được đánh dấu vào kênh dẫn điện, ít nhất một trong số các nucleotit được đánh dấu chứa nucleotit, phân tử liên kết được gắn với nhóm photphat của nucleotit và thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử đặc hiệu nucleotit được gắn thêm vào đó, nhờ đó một trong số các nucleotit được đánh dấu liên kết với polymeraza và trong đó phân tử liên kết bao gồm chuỗi alkyl, nhóm amit, chuỗi poly(etylen glycol), và triazol;

trong khi một trong số các nucleotit được đánh dấu được kết hợp, bắt đầu phản ứng oxy hóa-khử giữa thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử đặc hiệu nucleotit và kênh dẫn điện để thay đổi trạng thái điện tích của thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử đặc hiệu nucleotit; và

đáp ứng với phản ứng oxy hóa-khử, phát hiện đáp ứng của kênh dẫn điện.

10. Phương pháp theo điểm 9 trong đó:

bắt đầu phản ứng oxy hóa-khử bao gồm nạp điện áp tải vào kênh dẫn điện; và

phát hiện đáp ứng bao gồm nạp điện áp đọc vào kênh dẫn điện.

11. Phương pháp theo điểm 9 hoặc 10, phương pháp này còn bao gồm:

kết hợp đáp ứng của kênh dẫn điện với thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử đặc hiệu nucleotit của một trong số các nucleotit được đánh dấu được kết hợp; và

dựa trên thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử đặc hiệu nucleotit, xác định nucleotit của nucleotit được đánh dấu được kết hợp.

12. Phương pháp theo điểm 11, phương pháp này còn bao gồm cắt thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử đặc hiệu nucleotit khỏi một trong số các nucleotit được đánh dấu được kết hợp, nhờ đó nucleotit của nucleotit được đánh dấu được kết hợp được hợp nhất vào mạch mới bổ sung với axit nucleic khuôn.

13. Phương pháp theo điểm 12, trong đó:

kết hợp của một trong số các nucleotit được đánh dấu, bắt đầu phản ứng oxy hóa-khử, phát hiện, kết hợp, và xác định cùng nhau là chu kỳ giải trình tự; và

phương pháp này còn bao gồm:

thực hiện chu kỳ giải trình tự tiếp theo bằng cách:

cho phép nucleotit được đánh dấu tiếp theo của các nucleotit được đánh dấu kết hợp với polymeraza;

trong khi nucleotit được đánh dấu tiếp theo của các nucleotit được đánh dấu được kết hợp, bắt đầu phản ứng oxy hóa-khử khác giữa thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử đặc hiệu nucleotit khác và kênh dẫn điện để thay đổi trạng thái điện tích của thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử đặc hiệu nucleotit khác;

trong đáp ứng với phản ứng oxy hóa-khử khác, phát hiện đáp ứng khác trên kênh dẫn điện;

kết hợp đáp ứng khác của kênh dẫn điện với thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử đặc hiệu nucleotit khác; và

dựa trên thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử đặc hiệu nucleotit khác, xác định nucleotit của nucleotit được đánh dấu tiếp theo của các nucleotit được đánh dấu.

14. Phương pháp theo điểm 13, phương pháp này còn bao gồm:

cắt thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử đặc hiệu nucleotit khác, nhờ đó nucleotit của nucleotit được đánh dấu tiếp theo của các nucleotit được đánh dấu được hợp nhất vào mạch mới bổ sung với axit nucleic khuôn; và

lặp lại chu kỳ giải trình tự.

15. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 9 đến 14, trong đó thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử chứa nguyên tử kim loại được tạo phức để tham gia phản ứng oxy hóa-khử.

16. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 9 đến 15, trong đó:

thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử chứa 10 điện tích hoặc ít hơn ở trạng thái không được oxy hóa hoặc không được khử; và

thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử chứa từ 1 điện tích đến 100 điện tích ở trạng thái điện tích đã thay đổi.

17. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 9 đến 16, trong đó:

các nucleotit được đánh dấu chứa:

nucleotit được đánh dấu thứ nhất chứa deoxyadenosin polyphosphat làm nucleotit và thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử đặc hiệu nucleotit thứ nhất;

nucleotit được đánh dấu thứ hai chứa deoxyguanosin polyphosphat làm nucleotit và thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử đặc hiệu nucleotit thứ hai;

nucleotit được đánh dấu thứ ba chứa deoxyxytidin polyphosphat làm nucleotit và thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử đặc hiệu nucleotit thứ ba; và

nucleotit được đánh dấu thứ tư chứa deoxythymidin polyphosphat làm nucleotit và thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử đặc hiệu nucleotit thứ tư; và

các thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử đặc hiệu nucleotit thứ nhất, thứ hai, thứ ba và thứ tư là khác nhau.

18. Phương pháp theo điểm 17, trong đó hai trong số các thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử đặc hiệu nucleotit thứ nhất, thứ hai, thứ ba và thứ tư là điện tích dương ở trạng thái điện tích đã thay đổi, và trong đó hai thẻ còn lại của các thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử đặc hiệu nucleotit thứ nhất, thứ hai, thứ ba và thứ tư mang điện tích âm ở trạng thái điện tích đã thay đổi.

19. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 9 đến 18, trong đó các nucleotit được đánh dấu có mặt trong dung dịch đệm có nồng độ muối thấp.

20. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 9 đến 19, trong đó kênh dẫn điện là kênh của tranzito hiệu ứng trường.

21. Bộ kit bao gồm:

tế bào chảy, chứa:

kênh dẫn điện có phân tử nối được gắn thêm vào đó; và

polymeraza được gắn vào kênh dẫn điện thông qua phân tử nối;

axit nucleic khuôn được đưa vào tế bào chảy;

các chất phản ứng được đưa vào tế bào chảy, các chất phản ứng chứa các nucleotit được đánh dấu, ít nhất một trong số các nucleotit được đánh dấu chứa:

nucleotit;

phân tử liên kết được gắn vào nhóm phosphat của nucleotit, trong đó phân tử liên kết bao gồm chuỗi alkyl, nhóm amit, chuỗi poly(etylen glycol) và triazol; và

thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử được gắn vào phân tử liên kết, thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử được oxy hóa hoặc được khử bằng kênh dẫn điện khi được duy trì ở gần vùng cảm biến của kênh dẫn điện; và

bộ dò để phát hiện đáp ứng từ kênh dẫn điện khi phản ứng oxy hóa-khử xảy ra giữa thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử và kênh dẫn điện.

22. Bộ kit theo điểm 21, trong đó thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử được chọn lọc từ nhóm gồm feroxen, kẽm tetrabenzoporphyrin, coban phtaloxyanin, tris-(2,2'-bipyrimidin)ruteni, rượu 4-feroxenylbenzyl, kẽm(II) 5-(4-hydroxymetylphenyl)-10,15,20-trimesitylporphinato, và calixaren hoạt tính oxy hóa-khử.

23. Bộ kit theo điểm 21 hoặc 22, trong đó:

thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử chứa 10 điện tích hoặc ít hơn ở trạng thái không được oxy hóa hoặc không được khử; và

thẻ điện tích hoạt tính oxy hóa-khử chứa từ 1 điện tích đến 100 điện tích ở trạng thái được oxy hóa hoặc được khử.

24. Bộ kit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 21 đến 23, trong đó kênh dẫn điện là kênh của tranzito hiệu ứng trường.

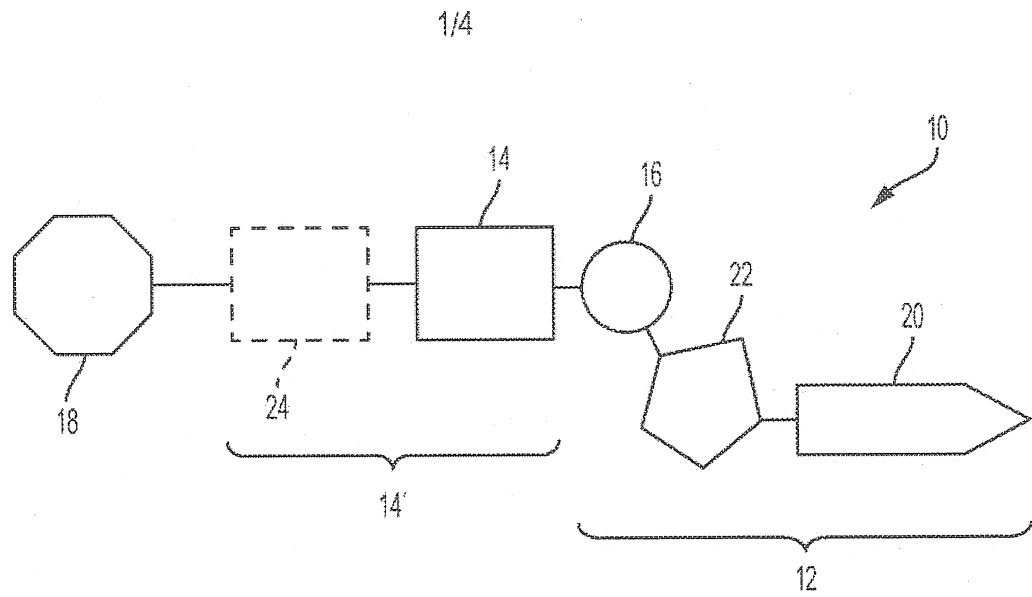


FIG. 1

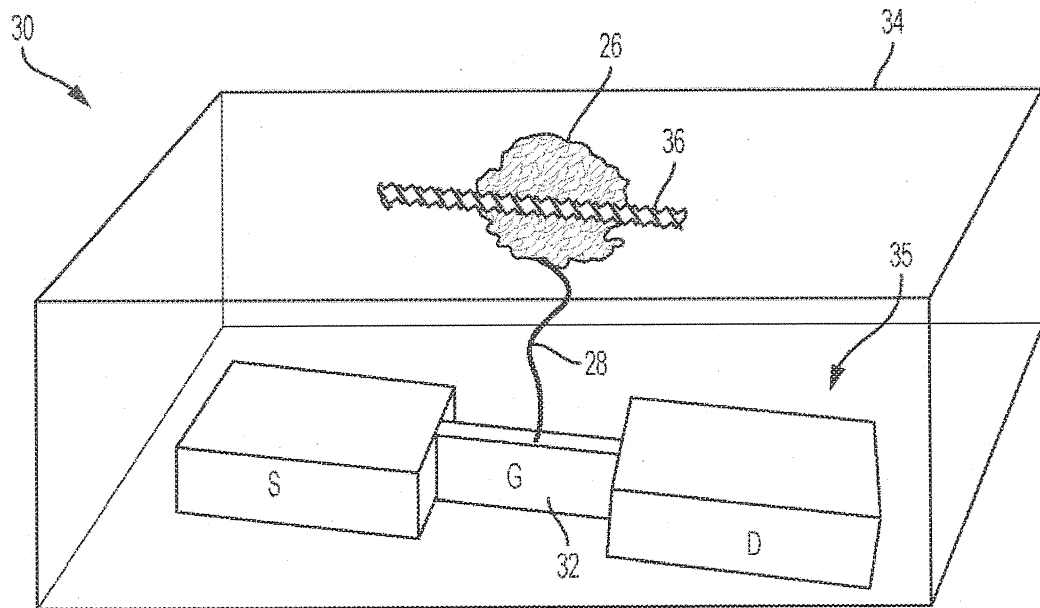


FIG. 2

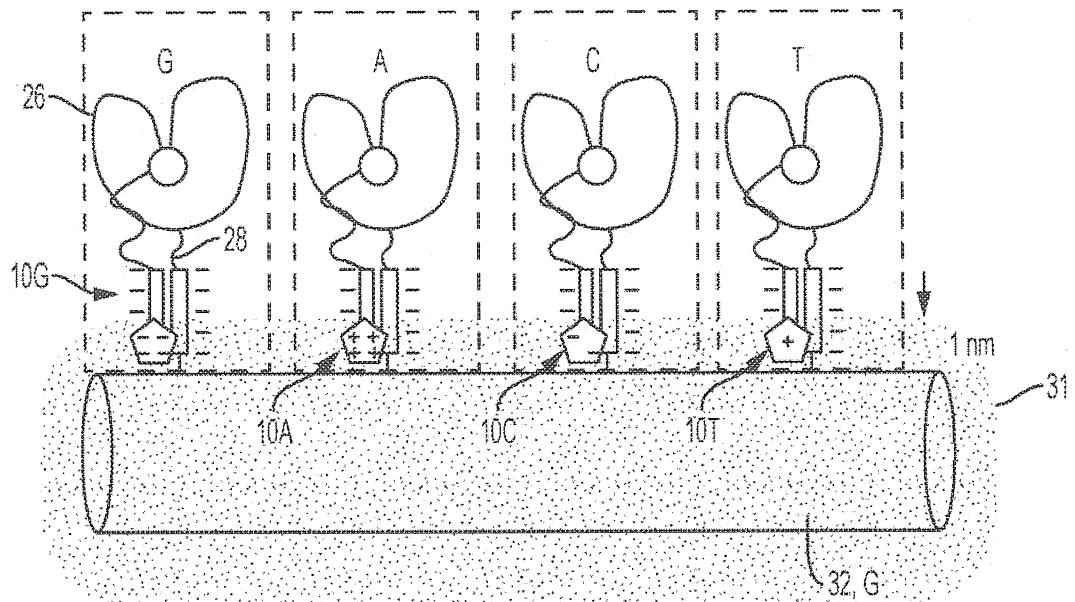


FIG. 3

3/4

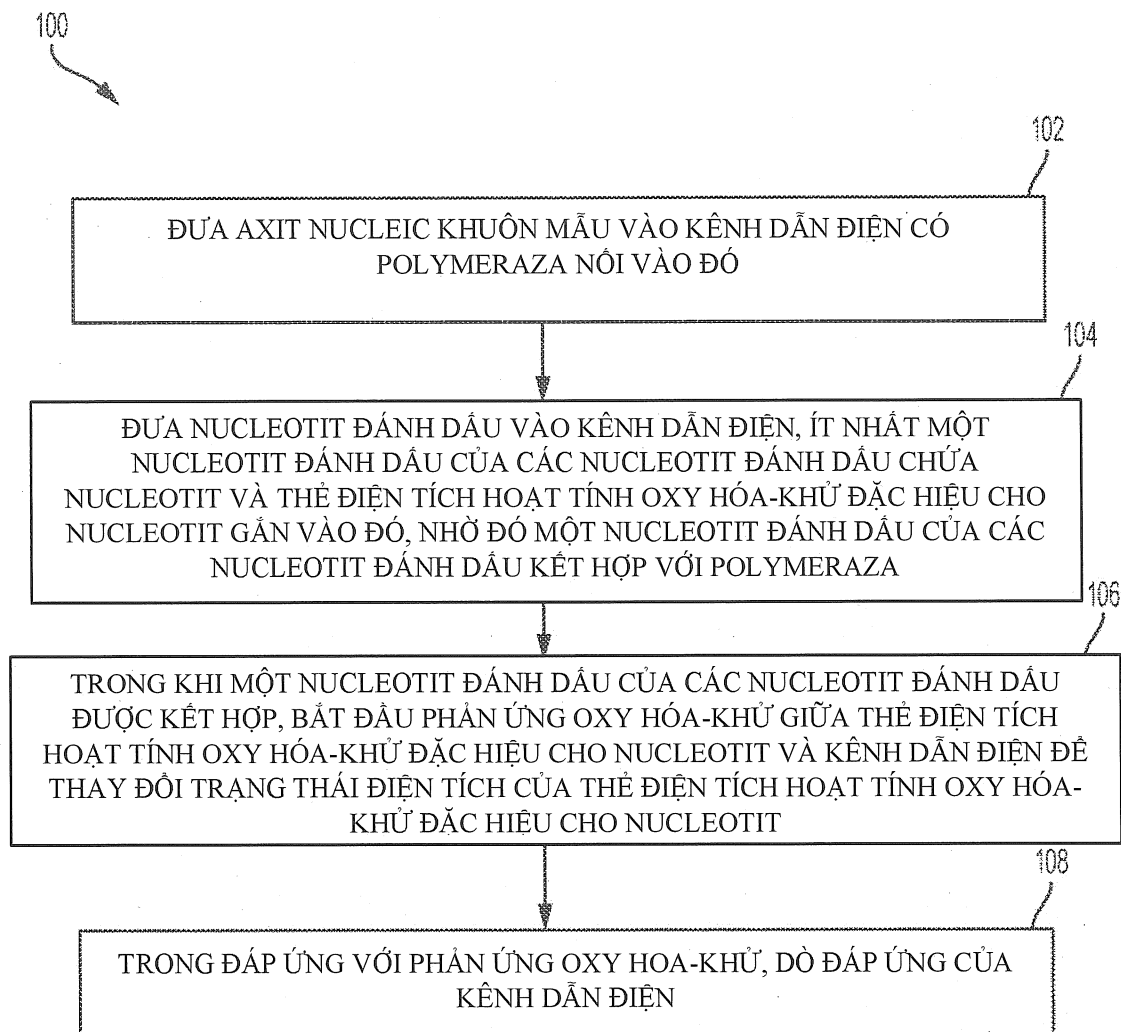


FIG. 4

